Albert Sasson

bio tehnologiile

sfidare și promisiuni

EDITURA TEHNICĂ

5
S 2

Albert Sasson

Biotehnologiile: sfidare și promisiuni

Traducere din limba franceză de
VIOLETA SCORADET

prof. Ioan
Nr. inv. 68019
Liceul

BUCUREȘTI
Editura Tehnică — 1988

Albert Sasson

Les biotechnologies: Défis et promesses

Publié par l'Organisation des Nations Unies pour l'éducation, la science et la culture, 7, place de Fontenoy, 75700 Paris

Imprimé par l'Imprimerie des Presses Universitaires de France, Vendôme

ISBN 92-3-202091-2
UNESCO-1983

Redactor : OLGA STOIAN
Tehnoredactor : V. E. UNGUREANU
Coperta : SIMION DUMITRESCU

Bun de tipar : 23. 03. 1988.
Coli de tipar 17,50
C. Z. : 577,1

Tiparul executat sub comanda nr. 742 la
Intreprinderea Poligrafică „13 Decembrie 1918",
str. Grigore Alexandrescu nr. 89-97
București,
Republica Socialistă România

Cuvînt înainte

Traducerea în limba română a cărții lui Albert Sasson "Les biotechnologies, défis et promesses", *publicată în colecția Sextant a Organizației Națiunilor Unite pentru Educație, Știință și Cultură, este un eveniment științific de prim ordin.*

În primul rînd pentru că biotehnologiile moderne sînt într-o perioadă de mare avînt, iar descoperirile și implicațiile lor aplicative în acest domeniu se succed cu o viteză pe care chiar specialiștii au dificultăți de a le urmări. Biotehnologiile moderne constituie, fără îndoială, domeniul cel mai nou și mai de perspectivă al biologiei contemporane.

În al doilea rînd trebuie menționat faptul că pe plan mondial se fac eforturi susținute pentru dezvoltarea cercetărilor privind manipularea artificială a informației genetice a plantelor, animalelor și microorganismelor, pe care se bazează în mare măsură biotehnologiile moderne. Guverne din multe țări și organisme specializate ale ONU au luat măsuri atît pentru aprofundarea cercetărilor în domeniul biotehnologiilor, cît mai ales pentru extinderea aplicațiilor lor în agricultură și industria alimentară, în industria chimică și farmaceutică, în valorificarea biomasei și în producerea de bioenergie, în recuperarea secundară a petrolului și în bioexploatarea metalelor din zăcămintele sărace etc. Bioindustriile au devenit o realitate a contemporaneității.

În al treilea, dar nu în ultimul rînd, traducerea cărții lui A. Sasson este utilă cititorului de la noi pentru faptul că în România există o politică de Partid și de Stat pentru dezvoltarea cercetărilor în domeniul ingineriei genetice și al biotehnologiilor moderne. De altfel Comitetul Național pentru Știință și Tehnologie a elaborat programe prioritare de cercetare în aceste domenii majore ale biologiei contemporane.

Ce sînt de fapt biotehnologiile și cînd au apărut ca un domeniu distinct al științei?

Fermentația empirică cu ajutorul microorganismelor a fost cunoscută încă acum cîteva milenii înaintea erei noastre. Primele biotehnologii empirice erau cunoscute în antichitatea îndepărtată și utilizate la fabricarea pîinii, berii, vinului, oțetului, brînzeturilor etc.

În secolul trecut și la începutul secolului actual s-au făcut progrese importante în cunoașterea microorganismelor utile, s-a început selecția unor sușe mai productive și a apărut industria microbiologică. De asemenea, s-au realizat progrese în crearea de soiuri de plante și animale mai productive necesare asigurării nevoilor alimentare a populației umane aflată în plină explozie demografică.

Secolul XX și în special perioada de după cel de al doilea Război Mondial, a însemnat un uriaș pas înainte în dezvoltarea cercetătorilor de genetică și inginerie genetică, de biologie celulară și moleculară, de biochimie și microbiologie, precum și a tehnicilor de culturi de celule vegetale, animale și microorganisme. S-au creat astfel premisele apariției biotehnologiilor moderne și a bioindustriei.

În esență biotehnologiile urmăresc să utilizeze microorganismele (bacterii, drojdii, mucegaiuri etc.), culturile de celule vegetale și animale pentru producerea unei game variate de substanțe utile economic.

Printre primele aplicații ale biotehnologiilor sînt cele care au implicații în industria farmaceutică. *Se preconizează producerea unei game extrem de variate de medicamente prin biotehnologii, cum sînt: antibioticele, hormonii, vitaminele, vaccinurile, substanțele antivirale și antitumorale, medicamentele antifungice, agenți tuberculostatici, anticorpi monoclonali, enzime etc. În ultima vreme s-au realizat deja progrese importante și a început producția industrială a unor medicamente cum sînt: insulina, hormonul de creștere uman, interferonul, anticorpii monoclonali, vaccinul contra virusului hepatitei B etc., precum și crearea unor truse de diagnostic de mare eficiență.*

Biotehnologiile moderne au mari implicații în industria alimentară. *Este vorba în primul rînd de proteinele monocelulare neconvenționale, produse cu ajutorul drojdiilor și bacteriilor, care pot utiliza o gamă variată de substraturi: parafine, grăsimi reziduale, zerul din industria laptelui, melasele din industria zahărului, reziduurile din distilerii, metanolul etc. Aceste proteine pot fi utilizate ca furaje sau chiar în alimentația umană, pentru ameliorarea valorii nutritive a furajelor și alimentelor. Tot în industria alimentară se folosesc biotehnologiile pentru sinteza unor aminoacizi esențiali, cum sînt lizina și acidul glutamic, utilizați în hrana animalelor și a omului, precum și producerea de enzime cum sînt: amilazelele, protează, pectinazele, celulazele etc. cu aplicații în alimentație și în furajarea animalelor. S-a dezvoltat de asemenea biotehnologia aditivilor alimentari, cu rol în conservarea unor alimente, pentru îndulcire, pentru ameliorarea gustului și aspectului alimentelor etc.*

Bioexploatarea petrolului și minereurilor *constituie un alt domeniu de mare perspectivă a biotehnologiilor moderne. Este cunoscut de pildă faptul că, prin tehnicile actuale, numai cel mult 40% din cantitatea de petrol din zăcăminte poate fi exploatată industrial. Cu ajutorul unor bacterii, cultivate pe diverse medii, are loc o creștere a gradului de recuperare secundară a țițeiului din subteran. Pe de altă parte, din minereuri foarte sărace în substanțe utile și din apele reziduale, pot fi recuperate, cu ajutorul unor microorganisme, o seamă de metale cum sînt: mercurul, plumbul, cositorul, argintul, aurul, platina, uraniul etc.*

În sfîrșit trebuie menționate și implicațiile biotehnologiilor în valorificarea unor cantități uriașe de biomasă, *provenită din procesul de creștere a plantelor agricole, din silvicultură, de la creșterea animalelor, din deșeurile industriei alimentare, deșeurile menajare etc. care pot fi utilizate pentru producerea de biogaz, de alcool utilizat ca substituit parțial al hidrocarburilor precum și pentru obținerea unei game variate de substanțe utile cu importanță în industria alimentară, farmaceutică, chimică etc. Pe această cale se combate totodată poluarea mediului ambiant cu aceste deșeuri de natură organică.*

O importanță deosebită au biotehnologiile moderne pentru manipularea genomului celulei vegetale și animale în vederea creării de soiuri de plante și rase de animale pe căi neconvenționale, mult mai repede și mai eficient. Plantele și animalele transgenice *au început să devină o realitate. De pildă, în ultima*

vreme s-au obținut prin selecția în culturile de celule în suspensie în prezența unor agenți exogeni, sau prin transferul de gen în protoplaste, genotipuri noi de plante rezistente la erbicide, la toxinele unor boli și dăunători, la aciditate etc.

Toate prognozele realizate de instituții specializate apreciază că revoluția biotehnologică *și aplicațiile ei în industria alimentară, farmaceutică, chimică, metalurgică, energetică etc. vor însemna peste 100 miliarde dolari anual la sfîrșitul secolului actual. Iată de ce pe plan mondial se fac eforturi financiare considerabile pentru dezvoltarea biotehnologiilor moderne, pentru pregătirea de specialiști, pentru crearea de noi tehnici automatizate și computerizate, utilizabile în bioindustrii. În acest context, o seamă de instituții specializate ale Organizației Națiunilor Unite, cum sînt UNESCO, FAO, OMS etc. sînt implicate în programe nu numai de dezvoltare a biotehnologiilor, dar și de transferul lor spre țările subdezvoltate sau în curs de dezvoltare, care nu pot prin mijloace proprii să realizeze revoluția biotehnologică.*

Se poate conchide că biotehnologiile moderne și bioindustriile create pe baza lor vor contribui la rezolvarea unor probleme majore ale umanității. În mod deosebit, trebuie să beneficieze de aceste realizări țările subdezvoltate sau în curs de dezvoltare, extrem de afectate de criza energetică mondială. Aceste țări vor putea totodată, cu ajutorul acestor biotehnologii, să-și amelioreze situația alimentară și sanitară, să realizeze progrese în protecția mediului ambiant.

Cartea lui dr. A. Sasson, director în cadrul UNESCO și specialist în biotehnologii microbiene, se înscrie în programele elaborate de Organizația Națiunilor Unite, vizînd răspîndirea cunoștințelor științifice despre biotehnologiile moderne și implicațiile lor în cele mai diverse ramuri ale economiei. Lucrarea aceasta de sinteză, scrisă cu competență și pe baza unei bibliografii bogate, reușește ca într-un volum relativ redus să abordeze cele mai importante probleme științifice, economice și sociale, legate de revoluția biotehnologică. Traducerea ei, deja în mai multe limbi de circulație, demonstrează că lucrarea a găsit un ecou binemeritat în opinia publică mondială. Inițiativa Editurii Tehnice, în acest context, de a pune la dispoziție publicului larg din țara noastră a acestei cărți, este binevenită și trebuie salutată. Aceasta și pentru faptul că biotehnologiile constituie o mare speranță a umanității pentru acest sfîrșit de secol XX și mai ales pentru secolul XXI.

Prof. dr. doc. *PETRE RAICU*
Universitatea București

Cuprins

Cuvînt înainte 3

Introducere 9

Natura și varietatea proceselor biotehnologice 14

Recombinări genetice și domenii de aplicare 18
- Recombinarea genetică *in vitro* 18
- Tehnici de introducere a ADN-ului în celulele bacteriene 20
- Recombinarea și expresia ADN-ului în celulele bacteriene 23
- Biosinteza insulinei umane cu ajutorul colibacililor 27
- Biosinteza somatotropinei umane și a altor substanțe hormonale 31
- Producerea de interferoni 37
- Producerea de substanțe imunogene și de vaccinuri 54
- Posibilități de recombinare genetică la microorganisme 63
- Recombinări genetice în celulele și embrionii de mamifere 65
- Alte domenii de aplicare și de interes ale recombinărilor genetice 74
- Elucidarea structurii, organizării și funcționării genomului 77

Hibridomi 89
- Fuziunea de celule somatice 89
- Hibridomi 90
- Producerea de anticorpi monoclonali 92
- Aplicații ale anticorpilor monoclonali 93
- Fabricarea anticorpilor monoclonali 99

Biotehnologiile și creșterea productivității plantelor 101
- Ameliorarea varietăților cultivate și creșterea productivității lor 101
- Cultura de celule vegetale și producerea de substanțe utile 113
- Extinderea și mărirea eficacității fixării biologice a azotului atmosferic 110

Producerea de substanțe utile cu ajutorul microorganismelor. Microbiologie industrială 139
- Avantajul și varietatea producțiilor microbiene 139
- Producerea de metaboliți primari 143
- Producerea de metaboliți secundari 150
- Producerea de enzime 156
- Poliozide capsulare 161
- Fermentații în mediu solid 162
- Bioconversii 167
- Microbiologie industrială și genetică 170
- Producerea de proteine cu ajutorul unor organisme monocelulare 173

Conversia deșeurilor și subproduselor agricole și industriale cu ajutorul microorganismelor 183
- Natura și cantitățile de subproduse și deșeuri 183
- Degradarea și conversia cu ajutorul microorganismelor 185
- Utilizarea microorganismelor în lupta împotriva poluării 187

Producerea de energie cu ajutorul microorganismelor pe bază de biomasă; bioenergia 190
- Biomasa și energia 190
- Producerea de etanol 191
- Producerea de biogaz 196

Producerea de hidrocarburi cu ajutorul lui *Botryococcus braunii* 206
Bioenergie: fotoproducerea de hidrogen și conversia energiei luminii 207

Dezvoltarea bioindustriei 211

Tendințe actuale ale dezvoltării bioindustriei 214
Formarea personalului calificat 239
Noile raporturi între învățământul universitar și industrie 242
Brevete și exploatarea invențiilor 252

Noi perspective, noi probleme 259

Perspective în aplicarea descoperirilor 259
Prevenirea riscurilor 262
Probleme etice și profesionale 265
Alegerea, transferul și asimilarea de biotehnologii 267
Cooperarea internațională 270

Bibliografie 273

Introducere

Pe la jumătatea anilor '60 se vorbea tot mai des despre naşterea unei „noi biologii" capabilă, prin aplicaţiile sale, să producă o schimbare fundamentală a procedeelor de fabricare a unui mare număr de substanţe chimice şi farmaceutice. Înmulţirea descoperirilor din biochimie, genetică, biologie moleculară şi celulară, între anii 1970—1980, readuce această „revoluţie" la ordinea zilei. La originea acestor speranţe se află, în primul rînd, elucidarea structurii şi funcţiilor cîtorva enzime, precum şi utilizarea lor, în formă imobilizată, în diverse procese de producţie industrială; problema îi privea mai ales pe microbiologi şi enzimologi. În al doilea rînd s-a situat descoperirea, de către specialiştii în genetică moleculară, a tehnicilor de modificare şi de transfer al ADN-ului între organisme. [1)]

Într-adevăr, cunoştinţele şi tehnicile ingineriei genetice au putut fi reunite şi puse la punct abia în urma progreselor determinante realizate în virusologie (cercetări pe bacteriofagi), în bacteriologie (investigaţii extinse asupra fiziologiei, geneticii şi biologiei moleculare ale colibacililor precum şi asupra plasmidelor), în genetică moleculară (cod genetic) şi în enzimologie (enzime de restricţie). În acelaşi timp deveneau clare şi aplicaţiile posibile ale acestor tehnici.

Biotehnologiile constau, de fapt, în utilizarea bacteriilor, levurilor şi celulelor animale şi vegetale de cultură, al căror metabolism şi a căror capacitate de biosinteză sînt orientate către fabricarea substanţelor specifice. După definiţia propusă de *Federaţia Europeană de Biotehnologie*, creată în 1978, biotehnologiile, datorită aplicării integrate a cunoştinţelor şi tehnicilor de biochimie, microbiologie, genetică şi inginerie chimică, permit, în plan tehnologic, să se tragă foloase de pe urma proprietăţilor şi capacităţilor microorganismelor şi culturilor celulare. Ele oferă posibilitatea de a produce, pornind de la resurse larg disponibile şi care se reînnoiesc continuu, o mulţime de substanţe şi compuşi esenţiali pentru viaţă şi creşterea nivelului de trai al oamenilor.

Aplicate la scară industrială, aceste biotehnologii constituie bioindustria (tabelul 1), ce cuprinde, pe de o parte, activităţile industriale în cadrul cărora biotehnologiile pot înlocui tehnologiile folosite în mod curent şi, pe de altă

[1)] Deşi recombinările genetice pot juca, în acest caz, un rol din ce în ce mai important, totuşi nu trebuie să confundăm experienţele de modificare şi transfer ale acizilor nucleici cu cele referitoare la realizarea fecundaţiei *in vitro* a ovocitelor de mamifere şi la manipularea embrionilor prin transplant de nuclee în vederea studiului diferenţierii celulare şi embrionare (Kelly, 1982).

Tabelul 1. **Clasificarea schematică a principalelor produse ale bioindustriei**

Tehnologie	Sănătate	Industrii agro-alimentare	Agricultură	Energie	Industrie chimică
Fermentații	Antibiotice	Acid citric	Biopesticide	Etanol	Chimia etanolului
	Vitamine	Aminoacizi		Acetona-butanol	Etilen
	Enzime	Nucleotide		Biogaz	Acetaldehidă
	Aminoacizi	Enzime			Acetonă
	Nucleotide	Biopolimeri			Butanol
	Steroizi				Butadienă
	Alcaloizi				
	Reactivi de diagnostic				
Inginerie enzimatică		Izoglucoză			
		Sirop de glucoză		Etanol	
Recombinări genetice sau inginerie genetică	Interferon				
	Hormoni				
	Vaccinuri				
Culturi celulare	Interferon	Proteine de organisme unicelulare	Cloni		
	Vaccinuri				
	Produse ale sîngelui				
	Anticorpi monoclonali				

parte, activitățile industriale în care biotehnologiile au un rol promotor esențial. Cele dintîi cuprind: în domeniul industriei chimice, sinteza substanțelor aromatice și de stimulare a gustului, producția maselor plastice și a produselor pentru industria textilă; în domeniul energiei, producția de etanol, metanol, biogaz și hidrogen; în sectorul biometalurgiei, extracția anumitor metale. Activitățile industriale în care biotehnologiile au un rol promotor cuprind industria alimentară (producție masivă de levuri, alge și bacterii în vederea furnizării proteinelor, aminoacizilor, vitaminelor, și utilizarea enzimelor), domeniul creșterii productivității agricole (clonaj și selecție varietală pornind de la culturi de celule și țesuturi, bioinsecticide), industria farmaceutică (vaccinuri, sinteza hormonilor, a interferonilor și antibioticelor), protecția mediului înconjurător și lupta împotriva poluării (tratarea apelor uzate și transformarea resturilor menajere, compostarea, fabricarea compușilor biodegradabili).

O evoluție a biologiei de o asemenea anvergură nu poate fi separată de etapele esențiale ale vastei întreprinderi care constă în elucidarea progresivă a mecanismelor fundamentale ale vieții (de Rosnay, 1981).

În 1953, structura completă a unei proteine, insulina, era stabilită de Sanger, în timp ce Crick și Watson arătau că acidul dezoxiribonucleic (ADN) avea o structură dublu-elicoidală. În 1963, Nirenberg a descifrat codul genetic al cărui caracter general se aplică de la bacterie pînă la om. Deveneau astfel accesibile mesajul ereditar și semnificația sa, și anume relația între codul genetic și structura proteinelor.

O a doua etapă a fost parcursă de-a lungul anilor '60, atunci cînd se determina, în mod automat, structura proteinelor, ca urmare a ameliorării

tehnicilor de analiză ale lui Sanger și a metodelor de degradare a proteinelor ale lui Edman și Begg (1967). Au fost apoi comercializate aparate capabile să determine secvența aminoacizilor proteinelor. În 1978 secvențele (structura primară) a peste 500 de proteine au fost în felul acesta stabilite și stocate pe ordinator sub forma unui „atlas de proteine" (Dayhoff și Eck, 1978).

După proteine, a venit rîndul acizilor nucleici, iar, în 1976, Gilbert și Maxam (Universitatea Harvard) și Sanger au pus la punct o metodă rapidă de analiză chimică a ADN-ului; se putea astfel determina secvența de 1000 de nucleotide pe săptămînă de un manipulator (Gilbert, 1981). Devenea așadar posibilă lansarea pe piață, între 1982 și 1985, a unei mașini automate de analiză a acizilor nucleici (și deci a genelor). Ca urmare a analizei ADN-ului, se putea, de asemenea, deduce, grație codului genetic, secvența proteinelor, a căror sinteză este guvernată de gene. Perfecționările aduse analiziei proteinelor, datorate punerii la punct a microanalizorului lui Hood și Hunkapiller, de la *California Institute of Technology* (1980), permiteau stabilirea secvenței de 100 pînă la 200 de aminoacizi pe zi, pornind de la numai 10 nanograme de proteine (zece miliardimi de gram).

După analiză, a treia etapă trebuia să fie cea a sintezei. Studiile lui Merrifield (1963) au făcut posibilă construirea și comercializarea primelor mașini automate pentru sintetizarea polipeptidelor. Acestea sînt utilizate în laboratoarele de cercetare și în industria farmaceutică.

După ce determinase secvența și structura ARN-ului de transfer (ARNt) al fenilalaninei, Khorana (mai întîi la Universitatea din Wisconsin, apoi la Massachusetts Institute of Technology, MIT) a reușit să sintetizeze, între 1970—1972, ADN-ul (adică gena) corespunzător acestui ARNt (Khorana, 1979). Khorana și colaboratorii săi trebuiau apoi să sintetizeze gena precursorului ARNt-ului tirozinei de *Escherichia coli* (Khorana, 1979). Metoda folosită, denumită metoda cu fosfodiester, a fost înlocuită cu metoda cu fosfotriester, mult mai avantajoasă, deoarece intermediarii de sinteză erau mult mai ușor de purificat (Letsinger și Ogilvie, 1967; Reese și Saffhill, 1968; în Téoule, 1982). O a treia metodă, cea cu fosfit, ar putea da rezultate și mai bune (Alvarado-Urbina ș.a., 1971).

Itakura și colaboratorii săi (City of Hope National Medical Center, din Duarte, California) au reușit, în 1977 și 1979, să sintetizeze genele somatostatinei și insulinei umane. Aceste gene au fost introduse în celulele de *Escherichia coli* prin tehnicile de recombinare genetică puse la punct de Boyer și colaboratorii săi de la societatea Genentech; pentru prima oară s-a făcut demonstrația expresiei genelor umane în celulele bacteriene.

Datorită multiplelor etape de separare a intermediarilor de sinteză a oligonucleotidelor, au fost elaborate procedee de sinteză pe suport solid, ca în cazul producerii de polipeptide. Lanțul oligonucleotidic în creștere este fixat pe un suport solid de una din extremități și elongația se face de la celălalt capăt. Reactivii în exces și subprodusele din ciclurile de sinteză sînt eliminate ușor printr-o simplă spălare. Aceste metode se caracterizează prin randamente convenabile. Aparatele numite „sintetizori" sau „asamblori" permit realizarea într-un mod mai mult sau mai puțin automat, a alungirii lanțului nucleotidic pe suportul său: adăugarea unui nucleotid are loc la fiecare 30 de minute, și ansamblul operațiilor poate fi programat (punere în rezervă, măsurare, transfer, injecție, eliminarea solvenților și reactivilor și controlul secvențe, evenimentelor de către un programator). La sfîrșitul operației, este necesară

detaşarea polinucleotidului răşinii, purificarea lui şi verificarea secvenţei nucleotidice, ceea ce presupune aproximativ o săptămînă de lucru.

În 1980, Itakura punea la punct primul „asamblor" de gene şi, puţin mai tîrziu, societatea Bio-Logicals, din Toronto, pune în vînzare o maşină produsă de Ogilvie, de la Universitatea McGill din Montreal, capabilă să sintetizeze, în 6 ore, un dodecanucleotid în ordinea dorită a nucleotidelor. În 1981, Hood, care inventase microanalizorul de proteine, a construit o altă maşină automată, comercializată de societatea Genetic Instruments. Bio-Logicals trebuia să lanseze, pînă la finele anului 1982, două modele de „sintetizori" de oligonucleotide, unul semiautomat şi celălalat asistat de un ordinator. În 1982, preţul de vînzare al acestor „asambloare" oscila între 36 000 şi 39 500 de dolari pe piaţa americană (Téoule, 1982).

Sinteza de segmente de acizi nucleici care, în 1981, se făcea prin asamblarea succesivă de nucleotide, unul cîte unul, trebuia să se amelioreze rapid, unind între ele secvenţe mai lungi şi deja preparate, după un program stabilit. În timp ce în 1979 era nevoie de 2 ani pentru a sintetiza o genă de 120 de nucleotide, în 1981, unei maşini îi erau suficiente doar 3 zile (Alvarado-Urbina ş.a., 1981). S-a stabilit apoi că numărul de mesaje genetice descifrate în laboratoarele de cercetare creştea cu 15% pe lună, ceea ce duce la cvadruplarea numărului de secvenţe de gene cunoscute într-un an (de Rosnay, 1981). Dayhoff, de la National Biomedical Research Foundation, din Washington, care a realizat un atlas al secvenţelor de proteine, a reuşit, la sfîrşitul anului 1980, să introducă pe un ordinator, peste 350 000 de secvenţe de gene (virusuri, bacterii, om) publicate în revistele ştiinţifice internaţionale.

Sinteza totală a unui ADN avînd o secvenţă nucleotidică specifică se deosebeşte de replica *in vivo* sau *in vitro* a ADN-ului, catalizată de ADN-polimerază. Aceasta are nevoie, într-adevăr, de un tipar care este un fragment din molecula bicatenară a ADN-ului, şi ea constă mai degrabă în reproducerea cu fidelitate a unei informaţii decît în crearea uneia noi. În sinteza chimică este posibil să se introducă modificări în secvenţa nucleotidică şi să se observe urmările acesteia asupra funcţiei biologice a moleculei de ADN (sau de ARN) sintetizată astfel. Sinteza chimică oferă avantajul de a se putea studia procesele de reglare a sintezei acizilor nucleici precum şi cel al transcripţiei ADN-ului în ARN. În aceasta din urmă, rolul anumitor secvenţe nucleotidice, al celor promotoare, este capital; au fost determinate cîteva duzini din aceste secvenţe, dar numai modificarea sistematică a uneia dintre ele, datorită sintezei chimice, permite să se propună elucidarea rolului jucat de diferitele părţi ale promotorului în recunoaşterea ARN-polimerazei, formarea unui complex stabil între enzimă şi ADN, iniţierea transcripţiei.

Introducînd în mod sistematic, graţie sintezei, un nucleotid diferit într-o secvenţă nucleotidică, adică efectuînd o mutaţie dirijată, pot fi observate urmările ei asupra funcţiei acestei secvenţe în celulă. Astfel a fost realizată, în laboratorul lui Chambon (Universitatea Louis Pasteur, din Strasbourg), cu ajutorul unui oligonucleotid preparat prin sinteză, modificarea unui singur nucleotid în poziţia presupusă ca promotoare a ADN-ului genei responsabile de sinteza unei proteine din albuşul de ou de găină (ovalbumina). Această mutaţie a avut rolul pe care îl joacă în organizarea sintezei ARN-ului mesager, o secvenţă specială de nucleotide, numită „cutia lui Goldberg Hogness" (Téoule, 1982; v. pag. 82).

Polinucleotidele preparate prin sinteză pot servi la izolarea prin hibridare a ARN-ului mesager corespunzător care comandă sinteza unei polipeptide sau a unei proteine. Aceste „sonde" moleculare *(probe)* sînt preparate în felul următor: cunoscînd secvența unui fragment al proteinei cercetate, este posibil să se determine, cu ajutorul codului genetic, diferitele secvențe ale ADN-ului genei care guvernează sinteza acestei proteine; polinucleotidele sintetizate sînt amestecate cu ARN-ul mesager total extras din celula care produce proteina cercetată; hibridarea se produce între „sonda" polinucleotidică și ARN-ul mesager a cărui secvență prezintă complementaritatea cea mai strînsă, pornind de la ARN-ul mesager astfel izolat, transcriptaza inversă permite sintetizarea unui ADN copie . Lungimea și structura acesteia corespund în mare măsură celor ale genei proteinei.

În afara secvențelor de ADN care servesc la reperarea anumitor secvențe prin hibridare („sonde"), alte secvențe sînt fabricate prin anumite procedee specializate: secvențele promotoare, care sînt indispensabile transcripției ADN-ului în ARN-mesager și care au o mare afinitate pentru ARN-polimerază; secvențe de legătură; secvențe de ADN indispensabile la traducerea mesajului genetic.

Progresele spectaculoase ale biologiei, așa cum se exprimă ele în realizările ingineriei genetice sînt strîns legate de înaintarea impresionantă a tehnicilor analitice, ca ultracentrifugarea, marcarea moleculelor prin izotopi radioactivi, electroforeza, cromatografia de afinitate (de exemplu, tehnica separării moleculelor complexe prin anticorpii monoclonali corespunzători), electrofocalizarea bidimensională (permițînd analiza a 50 000 de proteine ale unei celule), microanaliza (de exemplu, determinarea structurii primare a unei proteine pornind de la numai 10 nanograme, dar și a structurii altor macromolecule biologice, ca polizaharidele asociate cu proteine în glucoproteine).

Dar, dacă este adevărat că aceste procese tehnice au contribuit la progresul cunoștințelor biologice, este rîndul științelor biologice de a produce, indirect, prin intermediul enzimologiei și al geneticii, biotehnologii avînd propria lor coerență, prezentînd proprietatea singulară de a fi fondate pe sisteme care funcționează în mod natural și nu artificial, ale căror mecanisme metabolice sînt folosite spre binele omului.

Natura și varietatea proceselor biotehnologice

Fermentațiile microbiene reprezintă, probabil, procesele biotehnologice cele mai vechi, după cum o atestă și descoperirea, în 1981, a unei tăbliţe babiloniene, datînd din anul 6000 î.e.n., care descrie modul de preparare a berii. În mileniul III î.e.n., sumerienii erau în măsură să fabrice aproape o duzină de soiuri de bere.

Perfecționarea procedeelor de fermentație, sporirea gradului lor de eficacitate, descoperirea unui mare număr de bioconversii microbiene merg mînă în mînă cu izolarea de substanțe de origine microbiană sau fungică, substanțe avînd tendința să înlocuiască compuși de sinteză ca, de exemplu, substanțe antihipertensive, antiinflamatorii și diverse produse antiparazitare. Astfel monenzina și lasalocidul tind să domine piața substanțelor coccidiostatice, iar avermectinele (produse de streptomicete) sînt foarte eficace în tratamentul bolilor provocate de helminți și artropode (în Demain, 1981). Experiențele clinice făcute cu acarboză (BAYg 5421), care este un inhibitor natural al glucozidazei intestinale și care este sintetizat de un actinomicet aparținînd genului *Actinoplanes* (Hillebrand ș.a., 1979, în Demain, 1981), aveau ca scop stabilirea eficacității acestei substanțe în tratamentul diabetului, al obezității și al hiperlipidemiei (tip IV). Un alt produs natural, mevinolina (sintetizată de *Aspergillus terreus*), s-a dovedit capabil să scadă procentul de colesterol la animale; derivatul hidroxiacid (acid mevinolinic) este un puternic inhibitor competitiv al 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzimă A reductază a ficatului (în Demain, 1981).

În ceea ce privește procesele biotehnologice cele mai recente, ele se întemeiază atît pe tehnicile de recombinare genetică precum și pe folosirea enzimelor, a celulelor sau organismelor celulare imobilizate.

Expresiile: recombinări genetice *in vitro* sau chiar recombinarea ADN-ului sînt de preferat expresiilor: manipulări genetice sau inginerie genetică. După National Institutes of Health ale S.U.A., moleculele de „ADN recombinat" sînt molecule de ADN sintetizate în afara celulelor vii prin legarea unor segmente de ADN natural sau sintetic cu molecule care pot să se replice într-o celulă vie. Principiul constă în a reuni un ADN „nativ" și un ADN „străin" într-un vector care este un plasmid bacterian sau un genom viral, și a-l introduce apoi într-o celulă gazdă, unde se va putea înmulți. Rezultatul: un clon de „celule transformate". Unul dintre obiectivele bioindustriei este de a avea la dispoziție „celule transformate" în stare să exprime mesajul genetic

străin pe care ele l-au integrat și deci apte să producă molecule proteice specifice în cantitate mare (Abelson și Butz, 1980).

Succesul acestor tehnici venea ca urmare a descoperirii enzimelor de restricție în 1972, de către Arber (Bâle) și Smith și Nathans (Johns Hopkins University) — premiul Nobel în 1978 — enzime care secționează acidul dezoxiribonucleic (ADN) în situsuri specifice, și ca urmare a caracterizării ligazelor care leagă fragmentele de ADN, și transcriptazei inverse care sintetizează ADN-ul pornind de la acidul ribonucleic (ARN) mesager. Enzimele sau endonucleazele de restricție precum și ligazele sînt indispensabile operației de inserție a uneia sau mai multor gene în ADN-ul vector, care va servi la introducerea acestei sau acestor gene în genomul unui microorganism.

Trebuie subliniat că în afara aplicațiilor eventuale în bioindustrie, aportul recombinărilor genetice la cercetarea fundamentală era important și privea structura genelor organismelor superioare, reglarea expresiei genice, structura proteinelor pornind de la cele ale acizilor nucleici, studiul recombinărilor genetice.

Tehnica enzimelor imobilizate a fost pusă la punct la sfîrșitul anilor '60 (enzimele fuseseră închise într-un gel poros sau fixate pe un suport solid) și folosite cu succes în producția penicilinelor semisintetice, a fructozei plecînd de la amidonul de porumb, cît și în realizarea testelor biochimice simple. Celulele sau organitele celulare imobilizate prezintă avantajul că ele conțin secvențe complete de enzime indispensabile sintezei compușilor complecși.

Dezvoltarea biotehnologiilor se întemeiază, așadar, într-o mare măsură pe existența unor laboratoare dotate de cercetări de microbiologie, biochimie, enzimologie și genetică microbiană și, de asemenea, pe existența colecțiilor de sușe inventariate și studiate regulat (Sasson, 1970). Taxonomia microorganismelor este o disciplină care nu trebuie neglijată: orice aplicație biotehnologică este condiționată de cunoașterea aprofundată a caracterelor sușelor microbiene. Ba mai mult, în măsura în care aceste sușe vor putea deveni obiectul unei protecții prin brevete, ele vor reprezenta cheia oricărei dezvoltări, atît la nivelul cercetării fundamentale cît și la cel al cercetării aplicate și al bioindustriei.

Examinarea situației trecute și actuale a microbiologiei industriale conduce de altfel la constatarea că există relații strînse între cercetarea fundamentală și cercetarea aplicată. Cercetările practice de acum un secol ale lui Pasteur au făcut posibilă stabilirea bazelor microbiologiei, imunologiei și biochimiei, în timp ce descoperirea antibioticelor, în anii '40, de către specialiști în microbiologia aplicată a furnizat instrumentele esențiale pentru dezvoltarea biologiei moleculare, determinînd o profundă transformare a industriei farmaceutice. În sfîrșit, în cursul ultimelor trei decenii, lucrările fundamentale de genetică microbiană au permis punerea la punct de noi tehnici privind aplicațiile industriale. O atare sinergie între știință și tehnologie este determinantă pentru progresul microbiologiei industriale.

Dar dacă procesele biotehnologice țin în mod esențial de microbiologie și de enzimologie, utilizarea celulelor animale joacă și în acest cadru un rol important: cultura de virusuri pentru producerea vaccinurilor, producția de interferoni; sinteza anticorpilor monoclonali prin hibridomi etc.

Culturile de țesuturi de mamifere au servit, de la începutul anilor '50, la cultivarea virusului poliomielitei pentru fabricarea vaccinurilor. Mai tîrziu, culturile de celule umane au devenit indispensabile pentru izolarea

și creșterea altor virusuri, pentru producția de proteine specifice (anticorpi și interferoni); ele erau în egală măsură deosebit de utile în cercetările asupra cancerului și chimioterapiei antivirale.

Un fragment de țesut embrionar este dezintegrat, apoi tratat cu tripsină astfel încît să se obțină o suspensie de celule izolate. Cînd aceasta este introdusă într-un recipient de cultură și lăsată să se depună, celulele se aplatizează, se divid și formează un strat monocelular pe suprafața plană a recipientului. În tehnica de cultură se utilizează cel mai frecvent flacoane cilindrice asupra cărora se exercită o mișcare de rotație lentă în jurul axei lor longitudinale. Dezvoltarea celulară și masa celulelor recoltate pot fi sporite prin introducerea, în suspensie, a unor microsfere constituite din polimeri sintetici care joacă rolul de suporturi pentru adeziunea și proliferarea celulelor.

Au fost produse culturi submerse și în recipiente agitate avînd un volum mai mare de 1 000 l.

Celulele animale se divid în cultură la intervale de aproximativ 24 de ore, în timp ce levurile se divid în 1,5—2 ore, iar bacteriile în 20—60 de minute. Celulele de mamifere pot pluti în mediul de cultură sau pot forma un strat monocelular la suprafața unui suport. Necesitățile lor nutritive sînt complexe, căci ele au nevoie de un amestec de aminoacizi și de baze purinice și pirimidinice pentru sinteza proteinelor și a acizilor nucleici, de glucoză ca sursă de carbon și de energie, de vitamine și săruri minerale care sînt indispensabile menținerii presiunii osmotice și a unui *p*H de circa 7,2. Mediul conține, de asemenea, mici cantități de antibiotice pentru prevenirea oricărei înmulțiri de bacterii, precum și 5—20% ser sangvin (de om sau de fetus bovin). Serul poate fi înlocuit, în unele cazuri, cu anumite proteine serice. Temperatura optimă de creștere este de 37°C, deoarece, sub 36°C, celulele se divid foarte lent sau deloc, în timp ce, la peste 38°C, ele mor. Majoritatea descendenților celulari, inclusiv cei de origine umană, pot fi păstrați, pentru un timp nedefinit, la — 180°C, în medii de compoziție specifică.

Rolul plantelor în dezvoltarea biotehnologiilor, deși de dată mai recentă, este esențial: utilizarea meristemelor pentru producția pe scară largă a clonilor de plante (v. pag. 103) și sinteza prin culturi de celule vegetale de diverși compuși, unii obișnuiți, alții mai rari (alcaloizi și alți metaboliți secundari sau idiolite).

În 1937, Gautheret reușise să cultive țesuturi de morcov nediferențiate. Asociațiile de celule astfel obținute (calusuri), separate de cele care le-au dat naștere, puteau fi fragmentate și repicate pe un mediu steril nou conținînd un hormon vegetal, auxina. Menținerea în cultură putea fi astfel nelimitată. Unele sușe izolate de către Gautheret erau întreținute în același mod.

Cultura celulelor vegetale izolate a fost realizată în 1954 de către Muir, Hildebrandt și Riker; tehnica a fost perfecționată în Franța de către Luz, în timp ce Bergmann trebuia să se inspire din tehnicile de cultură de bacterii pentru a cultiva suspensiile de celule vegetale. Metodele astfel puse la punct au fost descoperite în mai multe țări, printre altele, în Marea Britanie, ca urmare a studiilor lui Street. Izolarea protoplastelor de celule vegetale a fost realizată în 1892 de către Klercker, dar Cocking a pus la punct, în 1960, tehnica enzimatică pentru a le obține ușor și în cantitate mare. Fuziunea protoplastelor permitea sporirea numărului și varietății indivizilor hibrizi fără a se mai recurge la calea reproducerii sexuate (v. pag. 112).

Din 1957 Skoog și Miller obținuseră regenerarea rădăcinilor și tijelor prin tratare cu hormoni vegetali, auxină și kinetină. Morel va arăta ulterior că un alt fitohormon, giberelina, stimula proliferarea meristemelor și a diferențierii lor în embrioni întregi. Această regenerare are aplicații importante în agronomie, de exemplu: producerea de plante lipsite de virusuri sau multiplicarea de noi varietăți horticole și a unor specii care nu se reproduc pe cale vegetativă (v. pag. 103).

Diversitatea biologică la care se poate ajunge prin cultura de celule și țesuturi vegetale deschide perspective foarte interesante pentru cercetări privind producerea unor molecule noi și utile. Acestea vor putea fi sintetizate în măsura în care va fi posibilă trecerea la cultura în masă. S-a constatat, în mai multe rînduri, începînd cu 1970, că celulele cultivate sintetizau compuși care lipseau din plantă: astfel cele de *Catharanthus roseus* (*Vinca rosea*, saschiu cu flori roze, originar din Madagascar) produceau cîteva duzini de alcaloizi dintre care opt au putut fi identificați; patru dintre ei erau absenți în planta întreagă, iar doi erau pînă atunci necunoscuți (Pétiard, Hannequin, Steck și Roncucci, 1982).

Biotehnologiile ar putea găsi soluții la problemele penuriei alimentare și ale deficitului de proteine: reducerea costurilor de producție a aminoacizilor indispensabili rațiilor alimentare ale animalelor domestice, producția de proteine de organisme unicelulare pornind de la parafine și de la alte substraturi (celuloză, deșeuri agricole și industriale, ape uzate), clonarea plantelor și selecția unor varietăți cu performanțe superioare; iar într-un viitor mai îndepărtat, sinteza de proteine vegetale prin tehnici de recombinare genetică, controlul fixării biologice a azotului atmosferic și fostosinteza artificială.

B.B.L.I.C. - L.C.A.
Nr. inv. 68019
Liceul Che

Recombinări genetice și domenii de aplicare

Recombinarea genetică constă în schimbul de gene între doi cromozoni. Pontecorvo (1958) a definit recombinarea ca „orice proces capabil să dea naștere unor celule sau unor indivizi, asociind într-un mod nou doi sau mai mulți determinanți ereditari prin care se deosebeau strămoșii lor". Această recombinare este un eveniment obligatoriu la mamifere, în timpul formării gameților: în timpul meiozei, unele gene se schimbă între cromozomii omologi (*crossing-over*) și aceasta explică fuziunea caracterelor ereditare în cursul generațiilor succesive. La virusuri și bacterii, recombinarea genetică este mai rară decît la animale. Schimburile genetice urmate de recombinare se produc între organisme ale aceleiași specii sau care aparțin unor specii învecinate. Toate organismele posedă endonucleaze de restricție, care recunosc ADN-ul străin și îl degradează, împiedicînd astfel orice recombinare genetică între genoame prea îndepărtate.

Recombinarea genetică in vitro

Recombinarea genetică *in vitro* permite efectuarea unor schimburi de gene și dobîndirea de către o celulă a unei gene de la altă specie. Tehnica a fost aplicată bacteriilor, în special colibacilului, astfel că s-a ajuns la expresia unor gene din celulele animale sau umane.

Tehnica recombinării genetice *in vitro* cuprinde, așadar, extragerea ADN-ului din specii diferite, constituirea unei molecule hibride de ADN, reintroducerea moleculei recombinate într-o celulă vie pentru ca un nou caracter să se manifeste, cum ar fi producerea unei proteine specifice (fig. 1).

Izolarea genelor, care sînt segmente de ADN, se face cu ajutorul unor metode fizico-chimice al căror grad de dificultate este în funcție de complexitatea cromozomului. Dacă este relativ ușor să se izoleze o genă virală, este în schimb foarte dificil să se izoleze o genă umană. Se preferă, în acest caz, utilizarea unei metode indirecte, avînd ca punct de plecare ARN-ul mesager. Acesta din urmă este sintetizat în nucleul celulelor animale pornind de la ADN (transcripție), apoi această informație este transferată în citoplasmă, unde are loc translația într-o proteină, a cărei secvență de aminoacizi este dictată de către cea a nucleotidelor de ARN mesager (adică de structura

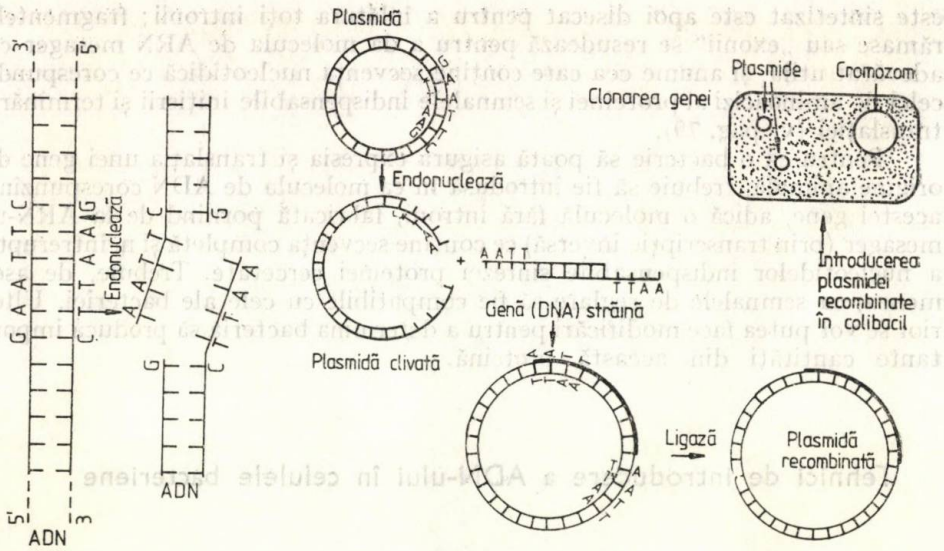


Fig. 1. Inserția unei gene într-o plasmidă de *Escherichia coli* și clonarea acestei gene în celulele colibacilului.

O plasmidă de *Escherichia coli* este clivată de o endonuclează de restricție într-un punct precis din fiecare din cele două lanțuri polinucleotidice ale moleculei de ADN, astfel încît extremitățile deschise ale plasmidei deschise se prezintă ca două scurte secvențe de dezoxiribonucleotide neîmperecheate (TTAA și AATT, adică patru nucleotide ale căror baze sînt timina și adenina).

Gena care trebuie introdusă în plasmidă este excizată de către aceeași enzimă de restricție, în așa fel încît două extremități ale sale sînt complementare secvențelor nucleotidice ale extremităților plasmidei (AATT și TTAA).

Sudura celor două molecule ADN, cel al genei și cel al plasmidei, este efectuată de o ligază.

Plasmida hibridă sau recombinată se introduce apoi într-o celulă de colibacil, care se multiplică pentru a da un clon ale cărui celule conțin plasmida hibridă și deci gena străină. Aceasta din urmă este deci clonat în celulele colibacilului. Ea va putea să inducă sinteza unei proteine specifice.

N.B. Este de asemenea posibil ca, plasmidei odată clivate, de către o enzimă specifică (transferaza terminală), să i se adauge o scurtă secvență de nucleotide la extremitățile ei (de exemplu patru nucleotide conținînd guanină); aceeași operație se face la nivelul extremităților genei străine, cărora li se adaugă secvențe de aceeași lungime și constituite din nucleotide complementare (de exemplu patru nucleotide ce conțin citozină).

ADN-ului). La bacterii, care nu au nucleu (Procariote), transcripția și translația se desfășoară în paralel, cel de-al doilea proces determinînd intervenția (ca în cazul celulelor animale) ribozomilor, la nivelul cărora se fixează ARN-ul mesager și se asamblează aminoacizii.

Molecula ADN-ului cuprinde, în afara informației (codul genetic) referitoare la structura ARN-ului mesager și deci a proteinei corespunzătoare, și semnale de reglare, care sînt secvențe aparte de nucleotide. Aceste semnale slujesc la inițierea transcripției și translației, ba chiar și la blocarea lor (de exemplu, la limita a două gene). Dar dacă codul genetic pare să fie universal în ansamblul regnului viu, cu alte cuvinte, dacă o secvență determinată de ADN va guverna aceeași proteină în organisme diferite, totuși semnalele de reglare la bacterii și în celulele animale nu sînt identice. La acestea, într-a devăr, informația genetică ce corespunde unei proteine nu este continuă, ci este întreruptă de segmente de ADN sau „introni". ARN-ul mesager care

este sintetizat este apoi disecat pentru a înlătura toți intronii; fragmentele rămase sau „exonii" se resudează pentru a da molecula de ARN mesager cu adevărat utilă, și anume cea care conține secvența nucleotidică ce corespunde celei de aminoacizi ai proteinei și semnalele indispensabile inițierii și terminării translației (v. pag. 79).

Pentru ca o bacterie să poată asigura expresia și translația unei gene de origine animală, trebuie să fie introdusă în ea molecula de ADN corespunzînd acestei gene, adică o moleculă fără introni, fabricată pornind de la ARN-ul mesager (prin transcripție inversă) ce conține secvența completă și neîntreruptă a nucleotidelor indispensabile sintezei proteinei cercetate. Trebuie, de asemenea, ca semnalele de reglare să fie compatibile cu cele ale bacteriei. Ulterior se vor putea face modificări pentru a determina bacteria să producă importante cantități din această proteină.

Tehnici de introducere a ADN-ului în celulele bacteriene

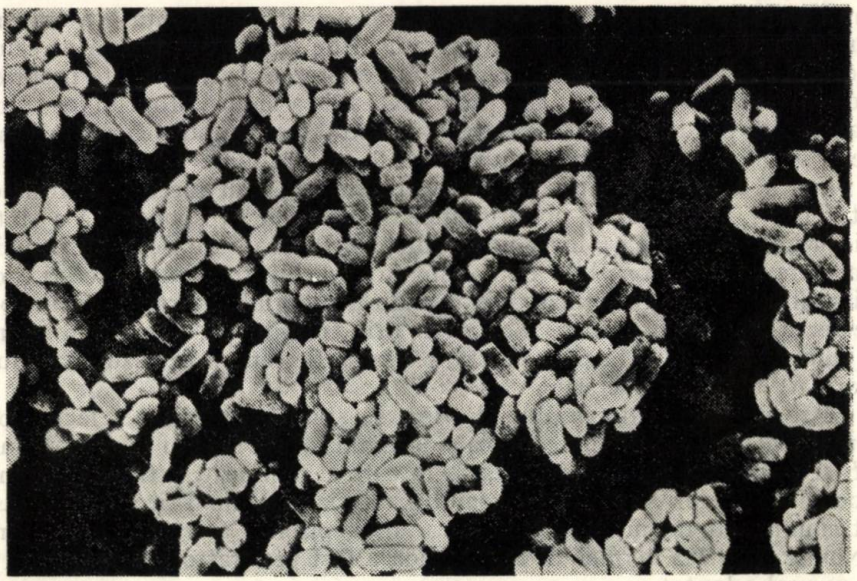
Pentru a se realiza introducerea ADN-ului (gena) într-o bacterie sînt folosite două tehnici. Prima constă în utilizarea plasmidelor ca vectori, iar a doua în utilizarea bacteriofagilor.

La începutul anilor '50, puțin după descoperirea conjugării la *Escherichia coli*, de către Lederberg, s-a stabilit că există două tipuri de parteneri în acest proces, al căror comportament este determinat genetic, și că informația genetică este transferată de la celula „mascul" la celula „femelă" sau receptoare. Caracterul genetic „mascul" sau factorul de fertilitate (*F*) este transferat, în cursul conjugării mai frecvent decît orice alt caracter genetic. În plus, acest factor era transferat independent de orice altă genă cunoscută. Lederberg observase că factorul *F* este destul de aproape de elementele genetice extracromozomiale, existînd în citoplasma organismelor superioare și, în 1952, el a dat numele de plasmide tuturor acestor sisteme extracromozomice.

În 1953, Hayes, care lucra la Hammersmith Hospital din Londra, descoperise că, în anumite împrejurări, factorul *F* putea să se asocieze unor markeri genetici și să inducă apoi transferul lor secvențial în timpul conjugării. De asemenea, putea să se detașeze de cromozom, trăgînd după sine, uneori, un fragment al cromozomului bacterian. Acest factor putea să fie definit ca un element extracromozomic, care se asocia din cînd în cînd cromozomului bacterian.

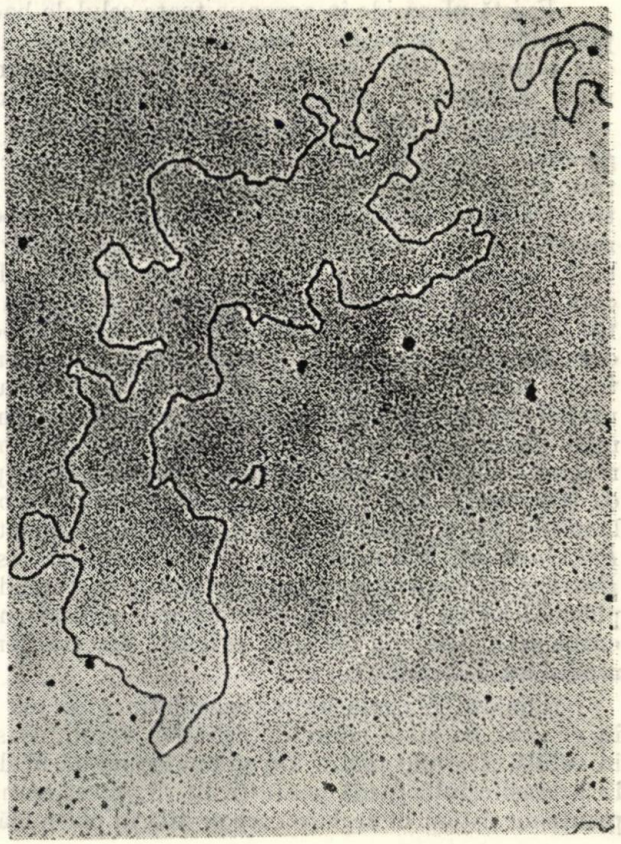
Jacob și Wollman (Institutul Pasteur din Paris) au observat o analogie de comportament între factorul *F*, bacteriofagul temperat λ și o altă plasmidă Col E1 (răspunzînd de sinteza colicinei, proteină care distruge *E. coli*). Ei au folosit, la acea vreme, termenul de epizom pentru a desemna orice element genetic care putea să se replice fie în mod autonom în citoplasmă, fie în asociație cu cromozomul bacterian.

În 1959 o descoperire remarcabilă a avut loc în Japonia, în cursul unor cercetări asupra unor bolnavi de dizenterie care nu reacționau la un tratament cu antibiotice în mod obișnuit eficace în tratarea acestei afecțiuni. Bacteriile patogene (*Shigella dysenteriae*) conțineau gene care le confereau rezistența



Celule de colibacil *(Escherichia coli).*

Microfotografie electronică luată la microscopul cu baleiaj.
× 6 700 (celulele au o lungime de aproximativ 2 microni).
[Foto: A. B. Dowsett, PHLS Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Marea Britanie.]



Plasmidă de *Escherichia coli.*

Microfotografie electronică a unei plasmide de *Escherichia coli* care este o moleculă circulară de acid dezoxiribonucleic (ADN) avînd în acest caz o lungime de 14,2 micrometri.
× 40 000
[Foto: A. B. Dowsett, PHLS Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Marea Britanie.]

la mai multe antibiotice în același timp și această rezistență era transmisă altor bacterii intestinale după un mecanism de transfer asemănător celui al factorului *F*. Acești factori de rezistență (*R*) prezentau mai multe proprietăți în comun cu factorul *F*, de pildă proprietatea de a induce propriul lor transfer de la o celulă la alta prin conjugare; s-a arătat, cu timpul, că unii dintre ei posedă secvențe nucleotidice comune cu ale factorului *F*.

Novick a descoperit, la începutul anilor '60, unii factori de rezistență la stafilococi, factori care, printre altele, purtau gena responsabilă a sintezei unei enzime, penicilina β-lactamaza sau penicilinaza care degrada penicilina și care era deci responsabilă de rezistența la acest antibiotic. Aceşti factori *R* ai stafilococilor păreau incapabili să inducă propriul lor transfer prin conjugare; erau transferați într-un mod pasiv prin transducție, adică prin intermediul unui bacteriofag. Lucrul acesta părea să fie comun în cazul mai multor factori *R* de enterobacterii.

Către jumătatea deceniului al 6-lea, se știa că majoritatea factorilor *R* de enterobacterii și de stafilococi (ca și plasmida Co1E1) erau diferiți de factorul *F* și de bacteriofagul λ, în măsura în care ei rămîneau extracromozomiali, în loc să se integreze în cromozomul bacterian în mod ireversibil, astfel încît ei infirmau definiția restrictivă a unui epizom. Ca urmare a propunerii lui Novick, în 1963, termenul de plasmidă a fost preferat celui de epizom și a fost general adoptat.

Există plasmide în aproape toate celulele bacteriene. Suşele care posedă plasmide pot da naştere unor variante care sînt lipsite de plasmide; în acest caz pierderea este permanentă, în măsura în care celula nu poate genera o nouă plasmidă, ci poate să o dobîndească pornind de la o altă bacterie.

Plasmidele sînt molecule circulare de ADN și reprezintă între 1 și 3% din genomul celulei bacteriene; dar această fracțiune redusă a informației ereditare dirijează importante caractere genetice care nu sînt, în general, sub controlul cromozomului bacterian. În felul acesta poartă plasmidele informația relativă la conjugarea celulelor bacteriene și sînt responsabile de mai multe boli cauzate la plante și la animale; ele permit utilizarea mai multor substanțe complexe din punct de vedere nutritiv și conferă rezistență la diverși agenți toxici, mai ales la antibiotice. Plasmidele stafilococilor conferă acestor microbi o rezistență la penicilină, la unii compuși de mercur, și la mai multe metale toxice (săruri de antimoniu, de bismut, de cadmiu și de plumb; ioni de arseniat și arsenit); există gene de rezistență la mai multe metale grele și pe anumite plasmide R de *E. coli* (Novick, 1980). Plasmidele sînt în egală măsură responsabile atît de unele afecțiuni diareice, de impetigo datorat stafilococilor, de fermentația laptelui și de transformarea lui în brînză cu ajutorul bacteriilor lactice, cît și, în mare măsură, de versatilitatea metabolică a speciilor din genul *Pseudomonas*. Plasmidele ar fi de asemenea responsabile de sinteza, prin *Bacillus thuringiensis*, a unei substanțe insecticide (*Novick*, 1980). Utilizarea plasmidelor ca vectori la introducerea genelor nebacteriene în celulele microbiene a fost, din 1975, la originea cercetărilor active privind structura și modul lor de replicare.

Numărul plasmidelor variază între 1 și 100 într-o celulă bacteriană și, în general, cu cît o plasmidă este mai voluminoasă, cu atît numărul cópiilor în celulă este mai redus. De vreme ce numărul diverselor plasmide prezente în aceeași celulă gazdă poate fi diferit, acest număr trebuie să fie determinat printr-un sistem de reglare care se află în plasmidă. Acest sistem a fost desco-

perit în 1972 de către Nordström (Universitatea din Odense, Danemarca) în cazul plasmidei R1 de *Escherichia coli*, și moduri de reglare analoage au fost scoase în evidență în cazul plasmidelor de stafilococi. La plasmida R1, numărul de cópii pare să fie controlat printr-o proteină (sau mai multe) care inhibă replicarea. Aceasta din urmă este asigurată la nivelul unei regiuni a ADN-ului echivalent cu maximum două kilobaze pentru plasmide de 50 de ori mai lungi sau chiar mai mult.

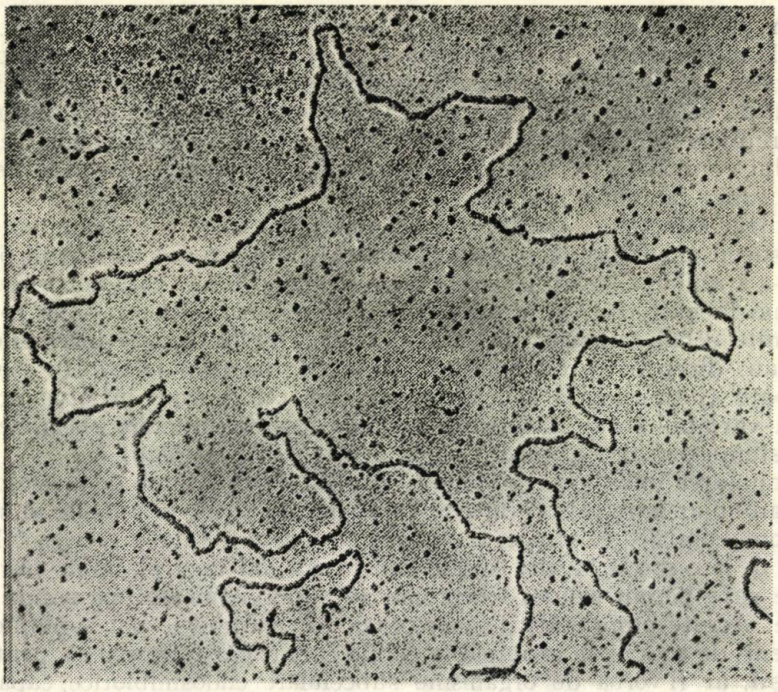
Contrar punctului de vedere tradițional care socotea că patrimoniul genetic al unei specii era același de la o celulă la alta și rămînea neschimbat pe perioade lungi, s-a stabilit că, de fapt, o proporție însemnată din caracterele genetice, nu numai la bacterii ci și la organismele superioare, este variabilă (prezentă în anumite celule sau sușe, absentă în altele), labilă (supusă pierderilor frecvente sau, dimpotrivă, cîștigurilor) și mobilă (transferabilă între celule sau care poate fi transferată în cadrul aceleiași celule dintr-un situs în altul). Această variabilitate se datorează asocierii acestor caractere plasmidelor sau altor sisteme genetice atipice (Cohen, 1976; Novick, 1980).

Conjugarea între bacterii poate fi însoțită de un schimb de plasmide între specii sau chiar între genuri diferite care sînt, de altfel, incapabile să schimbe gene cromozomiale. În sfîrșit, acest schimb poate fi valabil și în cazul transferului, de la o specie la altă specie concurentă, al unei plasmide purtătoare de gene care permit celulei receptoare să supraviețuiească pe seama celulei donoare. Aceste proprietăți demonstrează că plasmidele pot supraviețui independent, de ceea ce se întîmplă în celula care le găzduiește și că, pentru unii specialiști, ar fi vorba de organisme subcelulare endosimbiotice, capabile să rămînă stabile în celula gazdă, a cărei facultate generală de adaptare ele nu o diminuează, ci căreia îi conferă avantaje suplimentare pe acest plan. Într-adevăr, plasmidele pot dobîndi alte gene, în timp ce acelea care sînt conținute în ele pot suporta rearanjări în așa fel încît să ofere o sursă de informație genetică compatibilă cu nevoile celulei bacteriene gazdă, fără să pună în pericol eficacitatea propriei lor replicări.

A doua tehnică utilizată pentru introducerea unei gene într-o bacterie folosește ca vector un bacteriofag, al cărui genom (10—50 gene), integrează gena străină; aceasta va fi sintetizată întocmai ca și celelalate gene ale virusului, cînd acesta din urmă se va replica în celula bacteriană.

Recombinarea și expresia ADN-ului în celulele bacteriene

Cromozomul unei bacterii este o macromoleculă de ADN, cu lungimea de 1 mm și conținînd circa 3 milioane de nucleotide; această moleculă este repliată de mai multe mii de ori într-un spațiu avînd secțiunea de un micron. ADN-ul celulelor umane este repartizat în 46 de cromozomi; fiecare cromozom conține un lanț de ADN cu lungimea de 4 cm și numărul total al nucleotidelor este de ordinul a 3 miliarde. Enzimele de restricție sau endonucleazele de restricție secționează molecula de ADN în puncte precise, formînd astfel fragmente avînd de la cîteva sute la cîteva mii de nucleotide, care pot fi împărțite în funcție de mărimea lor. Se cunosc aproape 400 de enzime de restricție și fiecare dintre ele au proprietăți specifice de secționare a ADN-ului.



Plasmidă de Streptomyces coelicolor.
Microfotografie electronică a unei plasmide de streptomicetă, formată dintr-o moleculă bicatenară circulară de ADN, cu circumferința de 10 μm și conținînd în jur de 30 000 de perechi de baze, ceea ce corespunde unui număr de aproape 30 de gene. Grosimea plasmidei este mai mare decît în realitate din cauza depunerii platinei utilizate în tehnica de umbrire a preparatului. × 84000

[Foto: M. Bibb, D. A. Hopwood's Laboratory, John Institute, Marea Britanie. În: Scientific American (New York) vol. 245, nr. 3, 1981, p. 66]

În primul rînd, ARN-ul mesager, care guvernează sinteza unei proteine determinate (insulina, de exemplu), este extras din celule animale care produc această proteină; un segment din acest ARN mesager servește apoi la fabricarea unui segment complementar de ADN, datorită intervenției transcriptazei inverse (Gilbert și Villa-Komaroff, 1980). Un al doilea fragment de ADN este sintetizat de o altă enzimă, ADN-polimeraza. Etapa următoare constă în a introduce acest ADN bicatenar într-o plasmidă, utilizînd mai întîi o altă enzimă, transferaza terminală, care adaugă la extremitățile moleculei de ADN o scurtă secvență de nucleotide (în cazul sintezei insulinei, Gilbert a adăugat o secvență de 4 nucleotide, toate conținînd citozimă). Plasmida este clivată de o enzimă de restricție, *Pst*, într-un loc precis: în cazul fabricării insulinei de șobolan, Gilbert a utilizat o plasmidă de *Escherichia coli*, desemnată prin abrevierea pBR322, care conține două gene de rezistență la penicilină și la tetraciclină; enzima de restricție secționează plasmida în mijlocul genei care guvernează sinteza penicilinazei. Odată plasmida clivată, se adaugă, la extremitățile ADN-ului astfel deschis, o secvență de 4 nucleotide (toate conținînd guanină) prin transferaza terminală. ADN-ul celulelor animale se poate uni apoi prin extremitățile sale cu cele ale plasmidei, deoarece aceasta posedă nucleotide complementare (guanina-citozina); unele enzime bacteriene,

ligazele, efectuează această sudură și se obține din nou o plasmidă circulară, care este, de fapt, o moleculă de ADN recombinat (v. fig. 1 și fig. 2).

Pereții bacteriilor nu sînt în general permeabili la o moleculă de acest fel, dar, în prezența unei soluții diluate de clorură de calciu, pereții devin mai permeabili și anumite bacterii primesc în gazdă noua plasmidă. Pentru a o repera, se folosește un marker genetic care există pe plasmidă; în experiențele de producere a insulinei de șobolan, acest marker este cel al rezistenței la un antibiotic. Plasmida pBR322 era deschisă în mijlocul genei responsabile de sinteza penicilinazei; introducerea ADN-ului străin în plasmidă avea deci ca efect eliminarea rezistenței la penicilină, dar cealaltă genă responsabilă de rezistența la tetraciclină rămînea în stare de funcționare. Prin urmare, dacă suspensia bacteriană se întinde pe o placă de mediu agar-agar conținînd tetraciclină, vor supraviețui numai bacteriile care au găzduit ADN-ul recombinat și cele rezistente la tetraciclină; pornind de la una dintre aceste colonii, este posibil să se izoleze un clon de celule bacteriene, care conțin ADN-ul străin într-o plasmidă recombinată. Acest ADN se va putea exprima în bacteria care va produce, datorită propriilor ei mecanisme de sinteză, proteina căutată, adică proteina a cărei structură este determinată de cea a ADN-ului introdus.

Dificultățile constituirii unui ADN recombinat și a expresiei sale complete într-o celulă bacteriană constau în primul rînd în izolarea genei, și anume a

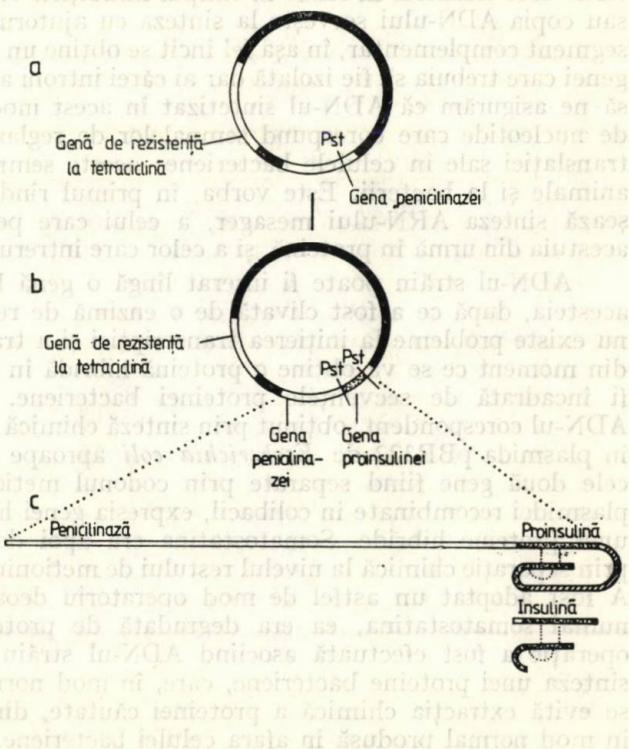


Fig. 2. Schema biosintezei insulinei de șobolan cu ajutorul unor colibacili cu genomul modificat (după W. Gilbert și L. Villa-Komaroff în Scientific American, vol. 242, nr. 4, 1980, p. 82).

Plasmida pBR322(*a*) care a servit drept vector pentru gena proinsulinei poartă genele rezistenței la penicilină (penicilinaza) și tetraciclină; este clivată de enzima de restricție *Pst* la nivelul genei penicilinazei.

Plasmida recombinată (*b*) are structura indicată în schemă așa cum a fost ea determinată prin analiza secvențelor de ADN. Această plasmidă recombinată permite unor cloni de colibacil, în care ea a fost introdusă, să sintetizeze molecula de proinsulină a cărei genă a fost inserată între cele două situri de separație care rezultă în urma acțiunii enzimei *Pst*.

Proteina hibridă sintetizată de clonul de colibacili (*c*) conține molecula de proinsulină și pe cea de penicilinază. Insulina biologic activă (*d*) este obținută eliminînd penicilinaza și partea mediană a moleculei de proinsulină (zona punctată corespunde punților disulfurice ale proinsulinei și insulinei).

segmentului de ADN, în celulele animale. În cazul genelor foarte scurte, adică responsabile de sinteza unor proteine faorte mici, se poate deduce din secvența aminoacizilor acesteia secvența dezoxiribonucleotidelor corespunzătoare și se poate realiza apoi sinteza chimică a acesteia din urmă.

În felul acesta Itakura și colaboratorii săi (City of Hope National Medical Center, la Duarte, în California) au sintetizat un ADN de 42 de nucleotide, care dirijează producerea de somatostatină, mic hormon hipotalamic de 14 aminoacizi, care are influență asupra eliberării insulinei și hormonului creșterii. Sinteza a fost făcută cu ajutorul trinucleotidelor asamblate unele cu altele. Din cele 52 de perechi de nucleotide astfel reunite, 42 corespundeau aminoacizilor hormonului, în timp ce restul serveau atît la integrarea genei sintetice plasmida pBR322 de *Escherichia coli*, cît și a unui segment de operon lactoză (lac) din aceeași specie bacteriană.

Un alt mod de a eluda dificultatea constă în a izola nu ADN-ul (gena) ci ARN-ul mesager corespondent care se află din abundență în celulele specializate în producerea unei proteine specifice: este cazul de exemplu, al ARN-ului mesager al insulinei în celulele β din insulele Langherans ale pancreasului, sau chiar al ARN-ului mesager al hemoglobinei în hematii. Acest ARN mesager nu conține intronii existenți în gena corespunzătoare (care au fost excizați de enzime specializate), și el poate să fie transferat într-o celulă bacteriană (ale cărei gene nu posedă introni). Pornind de la un mic segment de ARN mesager, transcriptaza inversă sintetizează un mic segment de ADN complementar (această enzimă se găsește în anumite ribovirusuri al căror ARN este transcris în ADN în timpul înmulțirii virale). Fragmentul de ADN sau copia ADN-ului servește la sinteza cu ajutorul ADN-polimerazei a unui segment complementar, în așa fel încît se obține un ADN bicatenar, echivalent genei care trebuia să fie izolată dar ai cărei introni au fost excizați. Dar trebuie să ne asigurăm că ADN-ul sintetizat în acest mod conține toate secvențele de nucleotide care corespund semnalelor de reglare necesare transcripției și translației sale în celulele bacteriene; aceste semnale sînt diferite în celulele animale și la bacterii. Este vorba, în primul rînd, de semnalul care declanșează sinteza ARN-ului mesager, a celui care permite inițierea translației acestuia din urmă în proteină, și a celor care întrerup transcripția și translația.

ADN-ul străin poate fi inserat lîngă o genă bacteriană sau în mijlocul acesteia, după ce a fost clivată de o enzimă de restricție, în așa fel încît să nu existe probleme la inițierea transcripției și a translației mesajului genetic, din moment ce se va obține o proteină hibridă în care secvența proteinei va fi încadrată de secvențele proteinei bacteriene. În cazul somatostatinei, ADN-ul corespondent, obținut prin sinteză chimică (genă sintetică) era inserat în plasmida pBR322 de *Escherichia coli* aproape de gena β-galactozidazei, cele două gene fiind separate prin codonul metioninei. După introducerea plasmidei recombinate în colibacil, expresia genei hibride ducea la producerea unei proteine hibride. Somatostatina era apoi detașată de β-galactozidază prin separație chimică la nivelul restului de metionină (de către cianobromură). A fost adoptat un astfel de mod operatoriu deoarece, cînd era sintetizată numai somatostatina, ea era degradată de proteazele bacteriene. Aceeași operație a fost efectuată asociind ADN-ul străin la gena care guvernează sinteza unei proteine bacteriene, care, în mod normal, este excretată; astfel se evită extracția chimică a proteinei căutate, din moment ce aceasta este în mod normal produsă în afara celulei bacteriene.

În noiembrie 1977, Booger, cofondator al societății Genentech (creată în 1976, la San Francisco) a făcut cunoscută obținerea primei sinteze a unei molecule complexe, molecula de somatostatină, cu ajutorul bacteriilor cu genomul modificat (10 000 de molecule de hormon/celula bacteriană). O sută de grame de colibacili, într-un fermentator de opt litri, au sintetizat 5 mg de somatostatină, cantitate obținută, mai înainte, de Guillemin și Schally, din o sută de tone de creier de oaie.

Biosinteza insulinei umane cu ajutorul colibacililor

Din 60 de milioane de diabetici, în 1979, 4 milioane erau tratați cu insulină. În S.U.A., numărul diabeticilor care făceau acest tratament era în 1979 de 800 000, dintre care aproape 100 000 de copii, și acest număr a crescut cu 6% pe an. În Franța, în aceeași perioadă, din cei 1 000 000 de diabetici recenzați, 150 000 aveau nevoie de insulină, 550 000 erau considerați nedependenți de insulină, și 300 000 se vindecau printr-un tratament dietetic adecvat (Osusky, 1982). Diabetul cuprinde, de fapt, mai multe maladii diabetice: formele care necesită un tratament cu insulină sînt cele datorate distrugerii selective a celulelor care secretă hormonul (rolul insulelor lui Langherhans ale pancreasului în etiologia diabetului a fost studiat de sir Edward Sharpy-Schafer, care a dat numele de insulină substanței secretate de aceste insule); diabetele nedependente de insulină sînt mult mai frecvente și pot fi vindecate printr-un regim alimentar adecvat.

În 1921, Banting și Best, la Toronto, au izolat, din pancreasul de cîine, hormonul a cărui existență o presupusese Sharpy-Schafer și au demonstrat acțiunea lui antidiabetică. În 1922, insulina animală era injectată, pentru prima oară, unui băiat diabetic de nouă ani, și rezultatul a fost spectaculos. În 1923, firma farmaceutică americană Eli Lilly punea în vînzare prima insulină animală. Pancreasul de vită sau de porc, nefolosit de fabricile de conserve de carne, este furnizat de abatoare; odată detașat după o tehnică specială, pancreasul este congelat foarte repede, apoi expediat în vagoane frigorifice către uzinele de extracție. Greutatea unui pancreas de bou este între 200 și 250 g și în prezent este nevoie de 800—1 000 kg de pancreas pentru a obține 100 g de insulină cristalizată.

Acțiunea insulinei în organism a fost ameliorată începînd din 1935 cînd Hagedorn, în Danemarca, punea la punct o insulină cu întîrziere, a cărei absorbție devenea mai lentă prin adaosul unei protamine, apoi prin adaos de zinc. În 1946, cercetătorii danezi reușeau să prepare o insulină cristalină neutră (NPH), care urma să fie pe larg folosită în insulinoterapie. Apoi, cercetătorii societății Novo Industri, din Copenhaga, au descoperit că adaosul de protamină nu era indispensabil preparării insulinei cu întîrziere și de atunci există insulină ultralentă (absorbție în 48 de ore), insulină lentă și insulină semilentă.

Un diabetic dependent de insulină are nevoie în medie de 40 U/zi. Perfecționările aduse tehnicilor de preparare, de exemplu cele realizate de firma americană Eli Lilly, au permis concentrarea dozelor de insulină injectată

(100 U în loc de 40 U) sau administrarea unei cantități date de hormoni în cel mai mic volum.

Prima cristalizare a insulinei a fost realizată în 1952 și metodele de separare a hormonului altor substanțe hormonale (glucagon, opus insulinei; somatostatină, care inhibă secreția de insulină și glucagon) și a diverșilor produși provenind din degradarea sa au permis obținerea, datorită imunoelectroforezei și cromatografiei în fază lichidă de înaltă performanță, a unei insuline omogene, numită monocompusă sau monopic.

Insulina este alcătuită din două lanțuri polipeptidice A și B, compuse respectiv din 20 și 30 de aminoacizi, a căror secvență a fost stabilită în 1955 de Sanger. Sinteza acestor două lanțuri și unirea lor prin punți disulfidrice în insulină a fost realizată între anii 1963 și 1965 de trei grupe de cercetători din S.U.A., China și R.F.G. Complexitatea unei astfel de sinteze, care cuprinde 170 de reacții, cît și costul ei o făceau să fie greu de realizat la scară industrială. Cu toate acestea, în 1981, societatea daneză Novo Industri a putut să transforme insulina de porc în insulină umană, înlocuind reziduul de alanină care este al 30-lea aminoacid al lanțului B, cu un reziduu de treonină. Această substituție care se făcea pe cale enzimatică și purificarea prin cromatografie, care îi urma, au permis să se obțină o insulină umană monocompusă cu puritatea de 99%. Cercetările făcute pe cele două insuline monocompuse, de porc și umană, au demonstrat că acestea au aceeași activitate și aceeași durată de acțiune. Cele două mari producătoare de insulină erau, în 1982, companiile Eli Lilly (85% din piața americană, cu un brevet de fabricație datînd din 1923) și Novo Industri (47,5% din piața europeană). Din cele aproape 74 de miliarde de unități internaționale de insulină produse, 27 de miliarde au fost utilizate în S.U.A., 17 miliarde în Europa occidentală și 30 de miliarde în Europa Răsăriteană.

Cele două lanțuri polipeptidice ale insulinei fac parte dintr-o proteină cu 109 aminoacizi, numită preproinsulină. Cînd această moleculă este sintetizată în celulele β ale pancreasului, primii 23 de aminoacizi joacă rolul unui semnal, care permite moleculei să traverseze membrana celulară; acești aminoacizi sînt apoi detașați și rămîne proinsulina (46 de aminoacizi). Molecula de proinsulină se îndoaie, în așa fel încît să reunească primul și ulitmul segment al lanțului, în timp ce partea centrală a moleculei este separată de către enzime; rolul acestei părți centrale este de a permite alinierea corectă a celor două lanțuri ale insulinei.

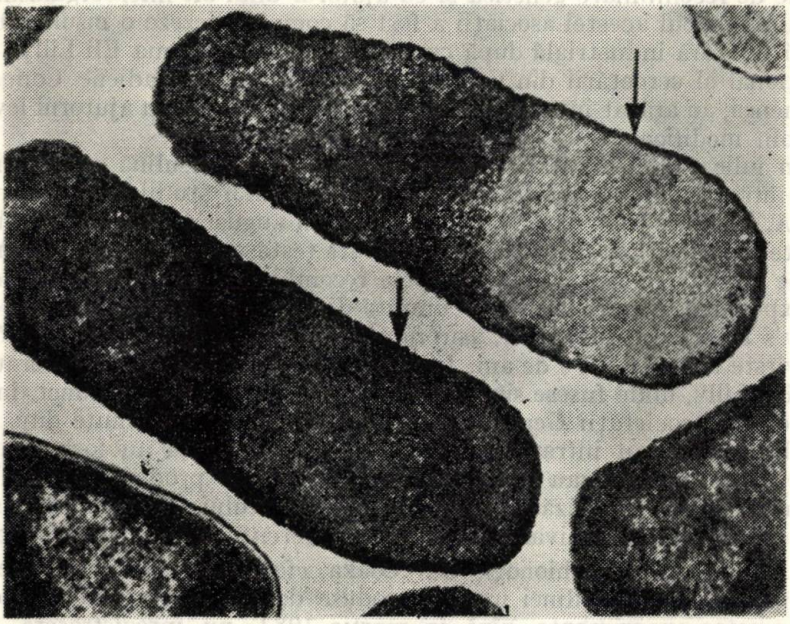
Gilbert și colaboratorii săi (Gilbert și Villa-Komaroff, 1980) au extras ARN-ul mesager al insulinei de șobolan (în acea perioadă nu era permis să se lucreze cu gene umane), dintr-o tumoare de celule β a pancreasului. ADN-ul corespondent ARN-ului mesager a fost inserat în plasmida pBR322 a colibacilului, în mijlocul genei penicilinazei, care este secretată natural. Plasmida recombinată conținea, după analiza secvenței nucleotidelor, mesajul genetic corespondent proinsulinei și nu preproinsulinei. Expresia plasmidei recombinate ducea la producerea, de către colibacil, a unei proteine hibride (peniclinaza + proinsulina), după care hormonul era separat prin acțiunea tripsinei. Naber și Chick (Elliot P. Joslin Research Laboratory, în Boston) urmau să demonstreze apoi că hormonul produs astfel acționa asupra metabolismului zaharurilor, după exemplul hormonului extras din pancreasul de șobolan.

În 1979, genele corespunzînd celor două lanțuri polipeptidice A și B ale insulinei umane au fost sintetizate în trei luni de către Crea, Kraszewski,

Hirose și Itakura (City of Hope National Medical Center, la Duarte, în California): 18 și 11 oligonucleotide au servit în fiecare caz. Sinteza acestor două gene a fost realizată, de asemenea, de către Goeddel și colaboratorii săi de la societatea Genentech. Fiecare genă a fost apoi unită cu o plasmidă, aproape de extremitatea genei β-galactozidazei de *Escherichia coli* (suşa K12), ca în cazul somatostatinei. Cele două polipeptide au fost detaşate de enzimă, purificate și asociate „in vitro" pentru a forma molecula completă de insulină. Randamentul inițial a fost de 100 000 de molecule de insulină/celula bacteriană.

Biosinteza, în celulele de *Escherichia coli*, nu a lanțurilor A și B ale insulinei, ci a moleculei de proinsulină umană, a fost și ea realizată pornind de la ARN-ul mesager corespondent și de la ADN-ul copie al acestuia din urmă sintetizat prin transcriptaza inversă. Biosinteza proinsulinei, care se pliază și se transformă, după formarea punților disulfidrice, în insulină, prezintă avantajul reducerii la minimum a diferitelor etape de extracție și izolare a hormonului.

Cercetătorii firmei americane Eli Lilly au constatat că inserările conținînd proinsulina sau cele două lanțuri A și B ale insulinei puteau ocupa pînă la 20% din volumul celulelor de *Escherichia coli*. Gilbert și colaboratorii săi au încercat să obțină sporirea cantității de hormon produse de bacterii, atașînd ADN-ului scurte secvențe nucleotidice (promotori), care făceau posibilă o expresie mai bună a ADN-ului în plasmida recombinată. Mai multe cópii ale



Biosinteza insulinei umane cu ajutorul celulelor de colibacil cu genom modificat.
Cele două celule de colibacil *(Escherichia coli)* reprezentate în această microfotografie electronică conțin incluziuni care pot ocupa pînă la 20% din volumul celular și care corespund unor molecule de insulină umană sintetizată de celulele bacteriene în care a fost introdusă gena hormonului prin recombinare genetică.
[Foto: D. C. Williams, R. M. Van Frank, W. L. Muth și J. P. Burnett, Eli Lilly, Indianapolis; în Biofutur (Paris), nr. 3, 1982, p. 26].

plasmidei recombinate puteau fi, de asemenea, introduse în celula bacteriană. La Centre for Applied Microbiology and Research, din Porton Down, Marea Britanie, s-au putut astfel obține aproximativ 200 g de proteină pe m^3 de mediu de cultură (adică aceeași cantitate cît se extrăgea din aproape 1 600 kg de pancreas de porc sau bou). Un alt mod de a spori cantitățile de insulină a fost inhibarea activității enzimelor bacteriene proteolitice sau punerea hormonului la adăpost de acțiunea acestora, „încapsulîndu-l" într-o proteină care va fi produsă de bacterie.

Cercetătorii de la Genentech, după zece luni, au reușit să producă, în septembrie 1978, insulină umană cu ajutorul unor colibacili cu genomul modificat. Față de extracția hormonului pornind de la pancreasul de porc sau bou, acest procedeu avea avantajul că nu era supus variațiilor aprovizionării de la abatoare; de asemenea putea să furnizeze o insulină umană, care să nu aibă, cu trecerea timpului, inconvenientele insulinelor animale (tulburări renale și afecțiuni oculare; un diabetic din 20 este alergic la insulina de origine animală). Firma farmaceutică Eli Lilly a investit 40 de milioane de dolari pentru construirea, la Indianapolis, în colaborare cu Genentech a unei uzine pentru producerea de insulină umană pe scară largă și pentru a o pune la dispoziția publicului în 1983 (piața insulinei în această țară a fost evaluată de societatea Genex la aproape 235 de milioane de dolari pe an în 1990).

După informațiile comunicate de Eberstadt and Co., din New York, Novo Industri s-a asociat cu Biogen pentru a produce insulină umană prin tehnicile de recombinare genetică și cu ajutorul unui alt microorganism decît colibacilul; scopul acestei asociații a fost să comercializeze o insulină umană produsă pe scară industrială după cum își propusese și firma Eli Lilly. Consiliul național al cercetării din Canada și laboratoarele canadiene Connaught, de asemenea, au arătat interes pentru biosinteza insulinei cu ajutorul levurilor cu genom modificat.

Din iulie 1980, cantitățile disponibile din noua insulină erau suficiente pentru întreprinderea unor cercetări clinice și a unor studii farmacodinamice în S.U.A., Franța, Japonia și Marea Britanie. În august 1980 au fost publicate rezultatele unei echipe de medici englezi care testase pe om, după experimentarea pe animale, insulina produsă prin recombinare genetică la *Escherichia coli*. Experiența a avut loc într-o unitate de medicină metabolică din cadrul lui Guy's Hospital din Londra, asupra a 17 persoane, voluntare și sănătoase, avînd vîrste între 24 și 56 de ani. Insulina folosită provenea din laboratoarele firmei Eli Lilly, unde fusese sintetizată după procedeul pus la punct, în 1978, de cercetătorii societății Genentech. Variațiile glicemiei obținute după injecțiile subcutanate sau intravenoase cu această substanță au fost comparate cu cele pe care le cauzau injecțiile cu altă insulină produsă pornind de la pancreasul de porc și utilizată în tratamentul diabetului dependent de insulină. Aceste variații erau echivalente, cu mici diferențe, concentrațiilor folosite.

În Japonia, firma Shionogi, din Osaka, efectua cercetările clinice necesare comercializării insulinei umane produse de Eli Lilly și Genentech. În cadrul acestor experimente, pînă în martie 1982, nu înregistrară reacții secundare.

O atare demonstrație, în cazul omului, a calității hormonului produs de bacterii de a nu fi vătămător pe termen scurt, trebuia să fie urmată de supravegherea de durată a răspunsului imunitar pentru a controla gradul de puritate al substanței și pentru a hotărî apoi folosirea sa terapeutică pe scară largă.

Lucrul acesta trebuia să se întîmple și în cazul proinsulinei umane biosintetice, care era omoloagă proinsulinei naturale, a cărei imunogenicitate pe termen lung rămînea încă de cercetat.

Aspectele economice au fost și ele importante. Într-adevăr, insulina umană biosintetică va putea atinge puritatea totală dar prețul de cost al acestei purificări va condiționa utilizarea și difuzarea ei pe scară largă. Acest preț de cost va trebui mai ales să fie competitiv în raport cu cel al insulinei umane obținute de firma daneză Novo Industri prin transformarea biochimică a insulinei de porc.

În octombrie 1982, Food and Drug Administration (FDA) a autorizat comercializarea, în S.U.A., sub numele de *Humulin*, a insulinei umane biosintetice produsă de societatea Eli Lilly, care urma să consacre suma de un milion și jumătate de dolari pentru lansarea pe piață a acestei substanțe. O autorizație analoagă a fost acordată, în septembrie 1982, pentru comercializarea Humulin-ei în Marea Britanie. Aceste autorizații, care au fost date doar după cinci luni de la data depunerii cererii la FDA, se sprijineau pe rezultatele concludente ale cercetărilor clinice realizate cu această insulină care fusese administrată atît unor voluntari sănătoși cît și unui număr de aproape o mie de diabetici din diferite țări (dintre care 400 din S.U.A.).

Biosinteza somatotropinei umane și a altor substanțe hormonale

Hormonul de creștere uman (hGH) sau somatotropina este un hormon secretat de lobul anterior al hipofizei. A fost izolat și purificat în 1963 de Ross și colaboratorii săi pornind de la hipofize umane prelevate *post mortem*. Absența acestui hormon este la originea nanismelor hipofizare, a căror frecvență a fost estimată la 7—10 persoane dintr-un milion (un copil din 5 000 în țările occidentale). Riguros specifică, somatotropina reprezintă singura posibilitate terapeutică pentru copiii care suferă de nanism hipofizar. Un anumit număr de studii au demonstrat că administrarea prin injecții intramusculare de somatotropină în doze mai mari de 6 mg pe săptămînă, sau 10 mg pe kg și pe an într-un ritm de 3 injecții pe săptămînă, ar face posibilă o creștere de mai mult de 6 cm în primul an. Tratamentul ar trebui să continue de la vîrsta de 4—5 ani pînă la sfîrșitul pubertății și chiar după aceasta, pentru a fi din plin eficace.

Plecînd de la o hipofiză prelevată de la un cadavru, s-au putut extrage, în 1981, 4—6 mg de hormon sub forma produsului farmaceutic finalizat. Cantitățile disponibile erau limitate și nu puteau satisface cererea. În S.U.A., prin colecta făcută de National Pituitary Agency s-au adunat bani pentru 650 000 de unități internaționale de somatotropină, obținute din 60 000 de hipofize și astfel s-a făcut posibilă tratarea unui număr de 1 500 de copii pe an. În Marea Britanie, în 1978, Medical Research Council a dispus de cantități suficiente din hormonul de creștere (provenind din 70 000 de hipofize prelevate de la cadavre) pentru a trata cele cîteva sute de cazuri de nanism hipofizar. Dar în 1982, ca urmare a diminuării cantităților colectate și randamentului de extracție a hormonului, au fost puse la dispoziția spitalelor 336 000 de unități internaționale de somatotropină pentru tratarea a numai 800 de

copii. În Franța existau dificultăți asemănătoare de aprovizionare (1,6 hipofize colectate de la 100 de cadavre față de 30 în țările scandinave), care au făcut ca autoritățile să păstreze acest tratament foarte scump (30 000—60 000 franci pe an de copil) doar pentru cazurile clinice indiscutabile și pentru persoanele aflate în curs de tratament (aproape 800 de copii erau tratați în 1928 și unii dintre ei primeau îngrijiri de 5 ani).

Societatea suedeză Kabi Vitrum AB asigura aproape 60% din producția mondială de somatotropină; ceilalți producători principali erau Nordisk Insulin în Danemarca, Serando în Italia și în Elveția și National Pituitary Agency în S.U.A. Cantitățile produse au făcut posibilă îngrijirea în cele mai bune condiții a unei treimi din cazurile de nanism hipofizar în țările industrializate. Un asemenea deficit ar fi și mai accentuat dacă s-ar lua în considerare și alte utilizări ale somatotropinei, din moment ce cercetări clinice au demonstrat avantajul folosirii acestui hormon în cazuri de fracturi de oase greu de consolidat (pseudoartroze), în arsuri, ulcere și hematopoieză (în aceste cazuri, motivul ar fi efectul anabolic general al hormonului).

În afara insuficienței cantităților de hormoni disponibili, mai sînt și alte probleme legate de caracterul eterogen al somatotropinei extrase din hipofizele prelevate de pe cadavre. Este vorba, de fapt, despre un amestec de diferite forme, dintre care 5 au o greutate moleculară de aproape 22 000, altele corespund unor dimeri ai hormonului respectiv, și altele unor fragmente rezultînd dintr-o proteoliză a acestuia. Această eterogenitate explica producerea de anticorpi la 30% din subiecții tratați, avînd drept consecință neutralizarea activității biologice a hormonului, dar acest procent a devenit 5% în urma ameliorării procedeelor de purificare. Pe de altă parte, exista riscul contaminării hipofizelor cu virusuri lente și era necesară supravegherea copiilor tratați timp de ani în șir, deoarece durata de incubație a acestor virusuri este deosebit de lungă.

Avantajele unui hormon de creștere produs de bacterii cu genom modificat erau deci evidente: cantități disponibile mai mari, puritate biochimică a preparatelor hormonale ferite de orice infecție virală.

Societatea suedeză Kabi Vitrum AB, care se arăta interesată, încă din 1967, de posibilitățile biosintezei somatotropinei, a semnat, în august 1978, un contract cu societatea americană Genentech în vederea izolării unei sușe microbiene capabilă să sintetizeze hormonul după introducerea genei corespondente. După opt luni de la semnarea acestui contract, cercetătorii de la Genentech izolau o susă de *Escherichia coli* K12 care prezenta această caracteristică.

Biosinteza somatotropinei (191 de aminoacizi) (fig. 3) a fost realizată de către Goeddel și colaboratorii săi. În măsura în care ADN-ul obținut pornind de la ARN-ul mesager corespunzător hormonului, transformat apoi în ADN bicatenar, ar fi dus la un precursor al hormonului, pe care bacteriile ar fi fost în stare să-l transforme în hormon activ, acești cercetători au ales următorul protocol: ADN-ul copie bicatenar a fost mai întîi clonat, apoi clivat de enzime de restricție pentru a da o secvență nucleotidică corespunzătoare hormonului în ansamblu, cu excepția primilor 23 de aminoacizi. Polinucleotidul de sinteză corespunzînd aminoacizilor de la 1 la 23, precedat de un codon de inițiere ATG, a fost apoi clonat. Cele două fragmente au fost în cele din urmă unite și clonate „în spatele" unei perechi de promotori lactoză și al unui sit de legătură a ribozomilor. Rezultatul final a fost obținerea

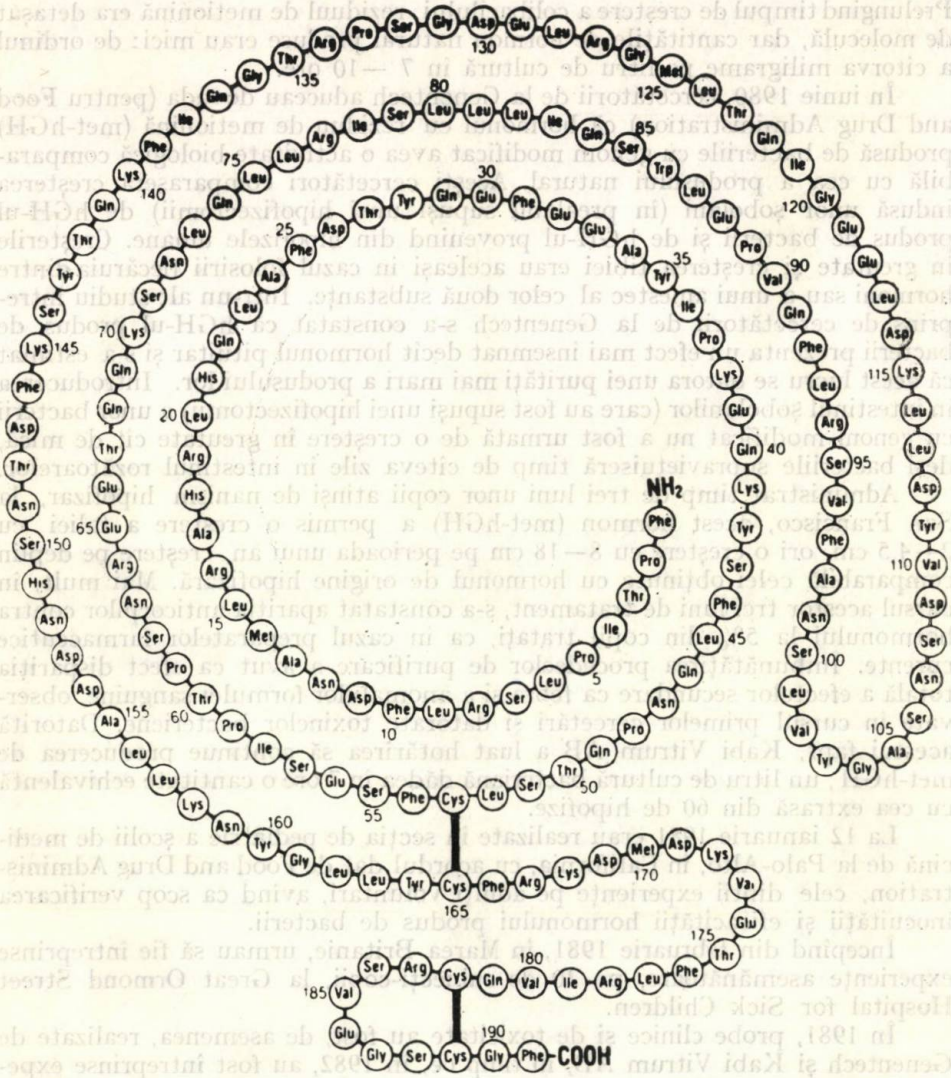


Fig. 3. Schema structurii primare a hormonului de creştere uman (somatotropina).
Molecula somatotropinei este formată din 191 aminoacizi. Hormonul sintetizat de colibacili cu genom modificat diferă de hormonul extras din hipofiză printr-un aminoacid adiţional care este un reziduu de metionină aflat la extremitatea NH_2 a moleculei.
[Reproducere din Raportul anual 1979 al societăţii Kabi Vitrum AB, Stockholm.]

a 2,4 μg de hormon pe 1 ml de mediu de cultură, ceea ce era egal cu 1% din proteinele solubile dintr-o celulă de colibacil cu genomul modificat (100 000 molecule/celulă bacteriană). Avantajul acestui mod de producere consta în faptul că hormonul avea greutatea moleculară corectă şi nu era legat de o altă proteină bacteriană, de care trebuia ulterior purificat (Newmark, 1979).

Dar hormonul astfel sintetizat avea un aminoacid suplimentar la extremitatea N-terminală a lanţului polipeptidic, care era un reziduu de metionină.

Prelungind timpul de creştere a colibacilului, reziduul de metionină era detaşat de moleculă, dar cantităţile de hormon natural produse erau mici: de ordinul a citorva miligrame pe litru de cultură în 7 —10 ore.

În iunie 1980, cercetătorii de la Genentech aduceau dovada (pentru Food and Drug Administration) că hormonul cu reziduu de metionină (met-hGH) produsă de bacteriile cu genom modificat avea o activitate biologică comparabilă cu cea a produsului natural. Aceşti cercetători comparaseră creşterea indusă unor şobolani (în prealabil supuşi unei hipofizectomii) de hGH-ul produs de bacterii şi de hGH-ul provenind din hipofizele umane. Creşterile în greutate şi creşterea tibiei erau aceleaşi în cazul folosirii fiecăruia dintre hormoni sau a unui amestec al celor două substanţe. Într-un alt studiu întreprins de cercetătorii de la Genentech s-a constatat că hGH-ul produs de bacterii prezenta un efect mai însemnat decît hormonul pituitar şi s-a estimat că acest lucru se datora unei purităţi mai mari a produsului lor. Introducerea în intestinul şobolanilor (care au fost supuşi unei hipofizectomii) a unor bacterii cu genom modificat nu a fost urmată de o creştere în greutate cît de mică, deşi bacteriile supravieţuiseră timp de cîteva zile în intestinul rozătoarelor.

Administrat timp de trei luni unor copii atinşi de nanism hipofizar, la San Francisco, acest hormon (met-hGH) a permis o creştere a taliei cu 2—4,5 cm, ori o creştere cu 8—18 cm pe perioada unui an, creştere pe deplin comparabilă celei obţinute cu hormonul de origine hipofizară. Mai mult, în cursul acestor trei luni de tratament, s-a constatat apariţia anticorpilor contra hormonului la 5% din copii trataţi, ca în cazul preparatelor farmaceutice curente. Îmbunătăţirea procedeelor de purificare a avut ca efect dispariţia totală a efectelor secundare ca febra şi a anomaliilor formulei sanguine, observate în cursul primelor cercetări şi datorate toxinelor bacteriene. Datorită acestui fapt, Kabi Vitrum AB a luat hotărîrea să continue producerea de met-hGH; un litru de cultură bacteriană dădea în 7 ore o cantitate echivalentă cu cea extrasă din 60 de hipofize.

La 12 ianuarie 1981 erau realizate în secţia de pediatrie a şcolii de medicină de la Palo-Alto, în California, cu acordul dat de Food and Drug Administration, cele dintîi experienţe pe adulţi voluntari, avînd ca scop verificarea inocuităţii şi eficacităţii hormonului produs de bacterii.

Începînd din februarie 1981, în Marea Britanie, urmau să fie întreprinse experienţe asemănătoare, pe 20 de subiecţi-copii, la Great Ormond Street Hospital for Sick Children.

În 1981, probe clinice şi de toxicitate au fost, de asemenea, realizate de Genentech şi Kabi Vitrum AB, în timp ce, în 1982, au fost întreprinse experienţe pe scară largă în Canada, S.U.A., Europa şi Japonia, avînd ca subiecţi pitici hipofizari aflaţi la pubertate.

Începînd din august 1982, în uzina din Strängnäs a firmei suedeze, urma să fie produs pe scară industrială, în fermentatoare de 1 500 l, hormonul de creştere biosintetică,pentru a fi comercializat spre sfîrşitul anului 1983. Cu ajutorul anticorpilor monoclonali s-a putut obţine o purificare mai accentuată a acestui hormon.

Preşedintele firmei Genentech, R. Swanson, a confirmat faptul că în urma probelor clinice concludente, producerea pe scară largă a hormonului de creştere umană urma să înceapă în 1984, marcînd în felul aceasta, după producerea de insulină în colaborare cu firma Eli Lilly în 1983, progresul firmei Genentech în acest domeniu.

Cercetătorii de la Institutul Pasteur, din Paris, au reușit, la rîndul lor, în 1982, să sintetizeze somatotropina umană cu ajutorul unor colibacili și al unor culturi de celule animale, iar Secția Producție a Institutului avea să urmărească producerea industrială a acestui hormon.

Biosinteza somatotropinei ar trebui să ducă la scăderea costului tratamentelor, din moment ce s-a estimat că în S.U.A. prețul acestui hormon ar putea să ajungă de la 15 la 5 dolari pentru o unitate internațională a hormonului în 1990, mai ales dacă s-ar lărgi evantaiul indicațiilor somatotropinei (s-a avut în vedere folosirea ei pentru accelerarea creșterii animalelor domestice și pentru stimularea producției de lapte la bovine). În Marea Britanie, în 1978, o fiolă conținînd 5 unități de hormon costa 1,25 lire sterline, în timp ce, în 1981, Kabi Vitrum AB o vindea cu 15 lire Departamentului Britanic al Sănătății și Securității Sociale. The Centre for Applied Microbiology and Research, din Porton Down, urma să contribuie la reducerea costului somatotropinei cultivînd sușa de *Escherichia coli* cu genom modificat obținută de Genentech în fermentatoare de 400 l, după primirea autorizației de la Genetic Manipulation Advisory Group, și să obțină astfel cantități mai mari de hormon al creșterii. Acest centru încheiase pe deasupra un acord cu Kabi Vitrum AB pentru îmbunătățirea procedeului de extragere a hormonului din hipofizele de cadavre (Newmark, 1980, 1981 a).

Pe de altă parte, faptul că se putea modifica secvența aminoacizilor, adică structura primară a hormonului, prin modificarea structurii nucleotidelor genei corespondente, ar face posibilă sinteza, cu ajutorul sușelor bacteriene, a unor analogi ai hormonului care ar fi foarte utili în studiul părților active ale moleculei (avînd influență asupra creșterii sau asupra neoglucogenezei, de exemplu) și al etiologiei moleculare a patologiei creșterii.

Și alți factori de creștere și de diferențiere de țesut ar putea fi sintetizați prin tehnicile de recombinare genetică, după izolarea ARN-ului mesager și sinteza genelor corespondente și anume: somatomedina A (Hall, 1972, Aberg, 1982) a cărei formare este stimulată de somatotropină și care favorizează fixarea sulfului la nivelul cartilajelor; somatomedina B (Uthne, 1973, Aberg, 1982) care stimulează sinteza ADN-ului în celulele de tip glial; alte somatomedine, care determină încorporarea prolinei în colagen și a uridinei în ADN, și care sînt în egală măsură dependente de hormonul de creștere.

Izolarea și sinteza realizate de către Guillemin ș.a. (1982, Salk Institute for Biological Studies, în La Jolla, California) a unui polipeptid avînd activitatea biologică a factorului hipotalamic de eliberare a hormonului de creștere (GRF, growth hormone-releasing factor), care nu fusese nici el încă izolat direct din hipotalamus, ar putea avea, de asemenea, aplicații terapeutice importante la om, în cazurile în care administrarea acestui polipeptid poate acoperi producția insuficentă de somatotropină. Guillemin și colaboratorii săi, care au izolat și sintetizat, în 1968, primul factor de eliberare hipotalamică (factor de eliberare a hormonului tireotrop, THRF, care reglează funcționarea glandei tiroide), au beneficiat de concursul mai multor echipe de clinicieni și au extras niște celule dintr-o tumoare pancreatică de om (insulinom care determina o acromegalie) factorul hpGRF (human pancreas growth hormone-releasing factor). Ei au sintetizat apoi în întregime acest peptid format din 44 de aminoacizi. Chiar dacă rămîne de demonstrat că factorul hpGRF era identic cu GRF cînd acesta ar fi izolat de hipotalamus, la om s-ar putea proiecta teste clinice, cu peptida de sinteză. Dacă aceste încercări vor fi conclu-

dente, folosirea lui ar putea fi autorizată nu numai în tratamentul nanismului hipofizar dar și în unele cazuri de diabet și pentru a ameliora starea celor cu arsuri grave (prin accelerarea regenerării țesuturilor). A dispune de mari cantități dintr-un factor avînd proprietățile GRF-ului va constitui, alături de biosinteza somatotropinei cu ajutorul bacteriilor cu genom modificat, un progres decisiv în tratamentul afecțiunilor datorate deficienței acestui hormon sau în ameliorarea reală a unor stări patologice. Acest hormon ar putea fi folosit de asemenea, pentru mărirea greutății și înălțimii anumitor specii de mamifere domestice; într-adevăr, în măsura în care structura somatotropinei diferă de la o specie la alta, folosirea factorului acționînd la nivelul hipotalamusului ar permite depășirea dificultății legate de extracția și sinteza fiecărui tip de somatotropină, de vreme ce factorul ar stimula sinteza hormonului de creștere la o specie determinată.

Genentech ar urma, de asemenea, să comercializeze somatostatina produsă de bacterii cu genom modificat. Unii afirmă totuși că biosinteza chimică este de preferat biosintezei prin recombinare genetică, în cazul oligopeptidelor conținînd mai puțin de 20 de aminoacizi. Această sinteză chimică a cunoscut, într-adevăr, progrese uluitoare, permițînd creșterea considerabilă a vitezei de producere a peptidelor. În plus, este procedeul cel mai comod pentru sinteza de peptide marcate ori de substanțe analoage conținînd aminoacizi modificați sau D-aminoacizi. Astfel au reușit Ying și Guillemin (1979) să sintetizeze substanțe pro și contra hormonului de eliberare a hormonului luteinic (LHRH), care este un decapeptid, prin înlocuirea unui D-aminoacid din poziția a 6-a și schimbarea aminoacidului N-terminal; se obțineau în acest caz substanțe avînd o acțiune de o sută de ori mai puternică față de aceea a hormonului natural și care contracara fecunditatea. O substanță care inhibă ovulația la șobolani fusese obținută de Coy (Universitatea Tulane, în 1979, prin modificarea reziduurilor de D-fenilalanină în pozițiile 1 și 2 și introducerea D-triptofanului în poziția 6 a LHRH-ului; activitatea unei astfel de substanțe antagoniste era de 30 de ori mai mare față de cea obținută de aceiași cercetători cu trei ani înainte.

Hormonii timusului s-ar putea preta și la cercetări avînd drept scop sinteza lor mai degrabă cu ajutorul unor bacterii conținînd ADN recombinat decît pe cale pur chimică. Timopoietina conține 49 de aminoacizi, dar numai un pentapeptid posedă activitatea biologică a întregii molecule. Factorul timic seric (FTS) este un nonapeptid, pentru prima oară izolat din ser de porc, dar care este prezent și în serul uman și în epiteliul timusului (Bach, Spitalul Necker, Paris).

β-Endorfina, care este un opioid cerebral conținînd 31 de aminoacizi, a putut să fie sintetizată de colibacili cu genomul modificat. Shine (Universitatea națională din Australia, Canberra), Fettes, Lan, Baxter (Howard Hughes Medical Institute Laboratories, Universitatea din California, San Francisco) și Roberts (Universitatea Columbia, College of Physicians and Surgeons, New York) au reușit, în 1980, să cloneze secvențele nucleotidice ale β-endorfinei în celulele de *Escherichia coli* și să obțină acest polipeptid în același timp cu β-galactozidaza. Tehnica aceasta consta în clonarea ADN-ului provenind din ARN-ul mesager corespondent al unei proteine mixte conținînd în afară de β-endorfină, secvențele corticotropinei (ACTH) și ale β-lipotropinei (β-LPH). Acest ADN conținea informația corespondentă aminoacizilor 44—90 ai β-LPH, care reprezentau cei 15 aminoacizi ai extremității C-ter-

minală a β-melanostimulinei (MSH) ca și secvența completă a β-endorfinei, cu excepția glutaminei C-terminală. Cercetătorii trebuiau deci să modifice acest fragment de ADN, adăugîndu-i codonul corespondent glutaminei C-terminală, introducînd un codon de stopare a transcripției și translației, înainte de a-l recombina cu cromozomul colibacilului, lîngă gena β-galactozidazei. β-Endorfina, care fusese detașată și purificată de proteina hibridă obținută, prezenta activitatea biologică a endorfinelor și reacționa cu un antiser specific. Ea se deosebea totuși de β-endorfina umană prin doi aminoacizi care puteau fi introduși modificînd doi codoni ai ADN-ului plasmidei bacteriene.

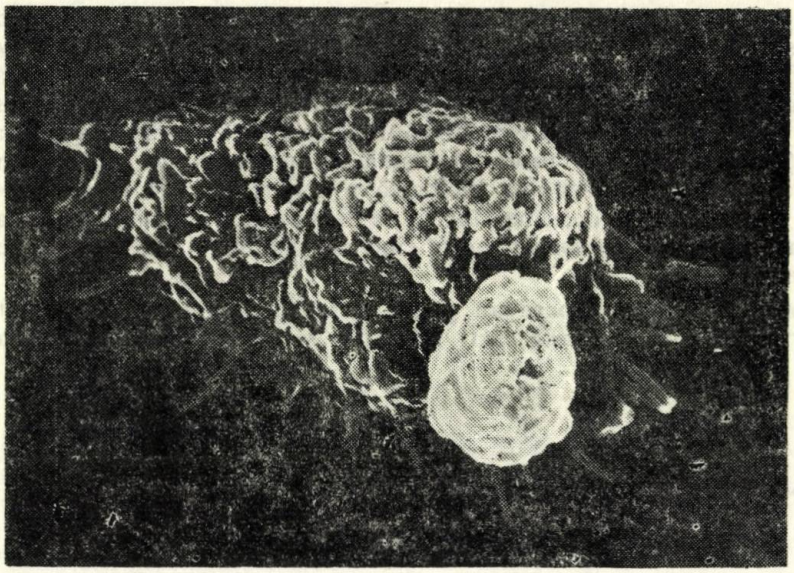
Modificări asemănătoare au putut servi, de asemenea, la sintetizarea β-endorfinelor care prezintă activități pro sau contra endorfinei naturale (Shine ș.a., 1980).

Producerea de interferoni

Aplicările recombinărilor genetice în scopul producerii de substanțe biologice destinate tratamentului maladiilor sau anomaliilor genetice confirmă superioritatea biologiei moleculare și celulare în cercetarea biomedicală actuală și de viitor. Prioritatea proceselor moleculare și celulare este într-adevăr recunoscută, în măsura în care sînt mai bine înțelese raporturile lor cu biologia și fiziologia normale și patologice ale omului. Medicamentul poate fi produs de organisme vii (și nu prin sinteză chimică), de celule bacteriene sau eucariote, modificate în consecință. Medicamentul este așadar un produs al conținutului celular și nu o substanță chimică exogenă, utilizată empiric și provocînd uneori reacții celulare care contracarează efectul curativ căutat. Așa stau lucrurile cu interferonii, produși de celule specializate pentru a lupta împotriva unei infecții virale, sau a unor anticorpi, sintetizați de organism ca răspuns la pătrunderea unui antigen.

Descoperit în 1957, de Isaacs și Lindenmann, la National Institute for Medical Research, de lîngă Londra, interferonul este o proteină produsă în cantități infime de celula animală sau umană cînd un virus pătrunde într-un organism. Interferonul este considerat ca prima linie a sistemului de apărare a organismului, atunci cînd se instalează o afecțiune virală. Primele cercecetări au demonstrat că interferonul poate fi folosit în tratamentul bolilor de origine virală ca banala gripă, hepatita sau zona zoster. Dincolo de rolul său în stimularea sistemului imunitar, interferonul poate și să inhibe înmulțirea celulelor anormale, ceea ce ar explica activitatea sa antitumorală.

Cum și alte vertebrate în afara omului produc interferon, această substanță este specifică și nu se poate lua în considerare folosirea interferonului de origine animală pentru tratarea afecțiunilor umane. Există, pe de altă parte, la om, mai multe tipuri de interferon: interferonul leucocitar (α), al fibroblastelor (β, care poate fi produs într-o cantitate mai mare, deoarece fibroblastele se înmulțesc în culturi, în timp ce leucocitele nu) și interferonul limfocitelor T sau interferon imun (γ).



Microfotografia unui limfocit în fața unui macrofag, luată cu ajutorul unui microscop electronic cu baleiaj.
[Foto: Institutul Pasteur, Paris. În: Biofutur (Paris), martie 1982, p.11]

Cantitățile reduse de interferon obținute prin metodele clasice, și anume esențialmente avînd ca punct de plecare sîngele, făceau dificilă realizarea cercetărilor clinice în mod satisfăcător. Astfel, în Laboratorul Central de Sănătate Publică din Helsinki, Cantell și colaboratorii săi au prelucrat, în 1978, 50 000 l de sînge uman pentru a obține aproximativ a zecea parte dintr-un gram de interferon pur, cantitate cu care se puteau trata 10 000 de cazuri de infecții virale benigne, dar numai 200 de bolnavi suferind de maladii virale cronice.

De aceea au fost făcute eforturi serioase în cîteva țări și în mai multe aboratoare pentru a produce cantități mai însemnate de diverși interferoni umani, prin tehnicile clasice dar și prin tehnicile de recombinare genetică, pentru a se efectua, în condiții cît mai bune, cercetările clinice indispensabile în determinarea acțiunii terapeutice a acestor proteine.

Producerea interferonului de către celulele sanguine și fibroblaste

Principiul producerii de interferon este identic, oricare ar fi natura celulelor cultivate. Acestea sînt infectate cu un virus (cel mai adesea de virusul Sendaï); după 24 de ore, se recuperează prin centrifugare ceea ce a rămas din cultură, adică „interferonul brut" care trebuie, după aceea,

purificat. Din doi litri de sînge s-au putut extrage 4 milioane de unități [1] de interferoni. Într-o perioadă de circa zece ani, cantitatea de interferon produsă în lume a provenit aproape integral din Laboratorul Central al Sănătății Publice din Helsinki, unde *Cantell* reușise să perfecționeze o metodă de producere a interferonului prin folosirea de leucocite provenind din sîngele donatorilor sănătoși. Acest laborator a fost primul producător mondial de interferon leucocitar, cu un număr de 400 sute de miliarde de unități pe an. O parte din acest interferon era livrată în S. U. A. în cadrul contractelor încheiate cu National Institutes of Health și American Cancer Society. Restul era utilizat pentru realizarea cercetărilor terapeutice efectuate la Stockholm și la Spitalul Universitar din Helsinki.

În Franța, începînd din 1960, Chany (Institutul Național al Sănătății și Cercetării Medicale, INSERM, Spitalul Saint-Vincent-de Paul, Paris), în colaborare cu Institutul Pasteur, și-a arătat interesul pentru producția semiindustrială de interferon. În martie 1980, problema urma să fie ridicată cu ocazia unei reuniuni a cercetărilor de la Centrul Național de Cercetări Științifice, INSERM și a Institutului Pasteur. Secția Producție a Institutului Pasteur, împreună cu Centrul Național al Transfuziei de Sînge (CNTS), care îi furnizează globule albe, au pus la punct o tehnologie ce face posibilă o producție de interferon leucocitar care crește în mod progresiv. În șase luni, începînd doar cu 26 de mii donații de sînge, I. P. P. a produs 48 de miliarde de unități de interferon, Franța devenind astfel al doilea producător european de interferon leucocitar. La sfîrșitul anului 1980, s-a stabilit un acord între I. P. P. și Ministerul Sănătății, acord în urma căruia se înființa o comisie științifică însărcinată cu stabilirea în detaliu a regulilor de experimentare a interferonului, pentru a se degaja, cît mai limpede posibil eventualele indicații precise ale acestei substanțe ca medicament antiviral și antitumoral. A fost hotărîtă astfel intensificarea producerii de interferon în cadrul acordului dintre I. P. P., Centrul Național al Transfuziei de Sînge și centrul de transfuize de sînge din Lille, care urmau să răspundă de producția de interferon brut, în timp ce purificarea acestuia din urmă era făcută de către I. P. P. Producția trebuia în felul acesta să depășească 100 de miliarde de unități de interferon pe an, din care 24 de miliarde (pentru tratarea a 200 de bolnavi) să fie cumpărate de Farmacia Centrală a Spitalelor, care urma să le repartizeze sediilor de experimentare, conform indicațiilor comisiei științifice. În iulie 1982 stocurile erau de 70 de miliarde de unități și doar vreo 20 de miliarde fuseseră utilizate; I. P. P. și centrele de transfuzie sanguină erau nevoite să întrerupă fabricarea unei substanțe pe care nu reușeau să o pună din producția lor. O atare situație se explica prin întîrzierea punerii la punct a celor dintîi experiențe în mediu favorabil (prima încercare — august 1981), întîrziere datorată numeroaselor lucrări preliminare indispensabile, cît și necesității împăcării dintre aspectele etice și științifice impuse de această testare (v. pag. 261). Consumul de interferon leucocitar, la vremea aceea, nu se ridica decît pînă la două miliarde de unități pe lună. În iulie 1982, Ministerul Sănătății considera că era vorba despre o întrerupere temporară și că trebuiau luate măsuri pentru îmbunătățirea funcționării comisiei științifice, pentru accelerarea și descentralizarea

---

[1]) Unitatea de activitate a interferonului corespunde unei cantități de substanță care poate asigura protecția împotriva unei afecțiuni virale la 50% din celulele de cultură.

experimentării spitalicești (prin extinderea ei în toată Franța și atașarea ei protocolului aplicat la nivel european) și pentru a nu pune în pericol întreprinderea originală și promițătoare care era politica franceză de producere și utilizare a interferonului. Cercetările clinice au trebuit totuși să fie întrerupte în noiembrie 1982 (v. pag. 261).

Tehnica producerii interferonului lecocitar prezintă două inconveniente: leucocitele normale nu pot fi cultivate și astfel este împiedicată extinderea producției; puritatea maximă a produsului final era net insuficientă și se obținea un amestec de interferoni α. Astfel că Institutul Mérieux, din Lyon, începînd din 1979, în colaborare cu Institutul Weizmann, din Rehovot (Israel), a creat o unitate de producere a interferonului plecînd de la culturi de leucocite provenind din sînge de bolnavi atinși de leucemie mieloidă cronică și stimulate de virusul Sendaï. Mai multe centre de transfuzie de sînge și servicii de hematologie furnizau celulele necesare Institutului Mérieux, pentru a alimenta un tip de producție cu un randament mult mai ridicat decît cel care utiliza leucocite de la subiecți normali. Dar, fiind vorba de celule canceroase, utilizarea acestui interferon leucocitar risca să fie limitată. Institutul Mérieux dispunea de un stoc de 1 500 de miliarde de unități de interferon brut, a cărei purificare trebuia să se efectueze printr-o tehnică reglată la Institutul Weizmann și care utiliza anticorpi monoclonali, astfel încît să se obțină un produs cu puritate de 80%. Acest produs trebuia să fie, mai presus de orice, un agent antiviral, folosit în special în tratamentul contra virusului herpes.

În august 1980, Wellcome Foundation Limited a încheiat un acord cu Sumitomo Chemical Company, prin care se permitea acesteia din urmă să folosească o tehnologie, pusă la punct de laboratoarele britanice, pentru producerea interferonului leucocitar pornind de la celule limfoblastoide umane provenite dintr-un limfom al lui Burkitt (50 de mii de unități/1 miliard de celule cultivate). Metoda consta în infectarea unei culturi de celule limfoblastoide cu virusul Sendaï, apoi extragerea interferonului produs, reținîndu-l cu ajutorul unor anticorpi monoclonali, pe coloane de cromatografie. Construirea instalațiilor de producere a acestui interferon de către firma japoneză a fost prevăzută pentru anul 1982 și trebuia precedată de realizarea unor probe clinice cu produsul furnizat de Wellcome Foundation. Costul acestor instalații a fost evaluat la cel puțin 10 milioane de dolari (1980).

Societatea suedeză Kabi Vitrum AB și filiala sa specializată în ingineria genetică, Kabigen AB, au început să producă interferon în 1980 și 1981, pornind de la celule limfoblastoide. La Institutul Mérieux, se cultivau și limfoblaste în cuve cu un volum de 2 000 l și interferonul obținut urma să fie purificat cu anticorpi monoclonali. Compania farmaceutică germană Hoechst producea, de asemenea, interferon leucocitar prin filiera normală și prin cea blastoidă.

În S. U. A., American Cancer Society anunțase la New York, în 1978, că urma să consacre două milioane de dolari pentru cumpărarea de interferon necesar efectuării unor experimente clinice asupra a patru tipuri de cancer. Acest buget avea să se mărească pentru a atinge cifra de 7 300 000 dolari, dar, de fapt, 1200 000 fuseseră cheltuiți în iunie 1980, din cauza insuficientelor cantități disponibile pe piață. Conform statisticilor (American Cancer Society), 450 g de interferon, produs și purificat prin tehnicile curente, costau 2 200 000 000 de dolari în 1980, în timp ce, după analiza făcută în

mai 1980 de o companie financiară americană, piața mondială de interferon ar reprezenta, în 1990, 2 960 000 000 de dolari; o astfel de sumă era considerabilă pentru o substanță care se afla în stadiul de experimentare și încă departe de cel de comercializare [1]. După părerea vice-președintelui acestei societăți, F. Rauscher, însărcinat cu cercetarea, laboratoarele angajate în producerea acestei substanțe nu puteau să lucreze în pierdere, deoarece, chiar dacă testele anticanceroase nu se dovedeau concludente, interferonul rămînea o substanță a cărei activitate antivirală era eficace și deosebit de interesantă.

Interferon Foundation a fost creată în 1980, la Houston, cu scopul de a strînge, în doi ani, cel puțin 20 de milioane de dolari, în special pe lîngă companiile petroliere. Compania Shell, de exemplu, a contribuit cu 2 milioane de dolari la această fundație și cu 1 milion de dolari la American Cancer Society.

National Cancer Institute a consacrat, în 1980, 10 milioane de dolari cercetărilor asupra interferonului. Compania farmaceutică Warner Lambert a obținut un contract de 895 000 de dolari pentru a livra, în doi ani, la National Cancer Institute, 50 de miliarde de unități de interferon leucocitar, pentru tratamentul a 150 de pacienți. Interferonul era produs prin împărțirea cercetării farmaceutice între Warner Lambert și Parke Davis, în unitatea de dezvoltare biologică din complexul de la Parkdale, situat în Rochester (Michigan). Producerea de interferon avea ca punct de plecare un sediment conținînd globule albe și alte proteine centrifugate ale sîngelui; operația presupunea 55 de manipulări în 8 zile; în timp ce controalele de puritate și testele de securitate necesitau încă 6 săptămîni.

Interferonul leucocitar se fabrica, în S.U.A., de alte laboratoare: cele ale societăților Genentech, Interferon Sciences, Schering-Plough (interferon α_2), și cel aparținînd lui Roche Institute of Molecular Biology. Interferonul α_2 se producea, de asemenea, în Japonia, de către Yamanouchi Pharmaceutical Company of Tokyo, care urma să pună în circulație acest interferon după realizarea testelor clinice în 1982.

Interferonul fibroblastic (β) este produs de fibroblaste (celule ale țesutului conjunctiv) provenind din țesuturile de fetus sau din prepuțuri de copii circumcișii. Cultura acestor celule prezintă un avantaj în raport cu modul de producere al interferonului leucocitar. Fibroblastele formează un strat monocelular în recipientele de cultură, ceea ce limitează randamentul. Acesta poate fi mărit prin introducerea în mediul de cultură a unor microsfere la care aderă celulele.

Tehnica producerii interferonului fibroblastic a fost pusă la punct în unitatea de cercetare a laboratoarelor Searle, în High Wycombe, Marea Britanie; capacitatea de producție a instalațiilor de cultură a fibroblastelor era în acest caz de 60 de ori mai mare decît în metodele anterioare.

Asociația creată între laboratoarele Searle și societatea japoneză de produse farmaceutice Mochida a avut ca obiect dezvoltarea producției de interferon fibroblastic și comercializarea acestuia în Japonia, după realizarea testelor clinice în 1981. Mochida avea o îndelungată experiență în fabricarea

---

[1]) După cum semnala revista Genetic engineering news, în 1982, în S.U.A., existau în jur de 30 de companii ale căror activități aveau ca obiect producerea de interferon natural sau biosintetic.

preparatelor enzimatice (producerea și comercializarea urokinazei, extrasă din urina umană) și a hormonilor. Interferonul β era de asemenea produs în Japonia de firma Hayashibara Biochemical Laboratories Inc.

Laboratoarele Searle furnizau, de asemenea, interferon fibroblastic spitalului și Institutului de cancerologie M.D. Anderson al Universității din Texas, pentru realizarea de teste clinice anticanceroase pe scară largă (cancere avansate ale sînului, un cancer al ganglionilor limfatici sau limfom).

National Cancer Institute a încheiat un contract cu societatea Flow General a cărei filială biomedicală, Flow Laboratories, urma să livreze institutului, în 1981, 50 de miliarde de unități de interferon fibroblastic (echivalentul a 50 000 de doze de tratament), produs printr-un procedeu reglat și brevetat de Massachusetts Institute of Technology (fibroblastele se cultivau la suprafața unor microsfere, iar randamentele erau sporite în urma anumitor perfecționări tehnice).

Interferonul fibroblastic era fabricat în S.U.A. de laboratoarele Collaborative Research și Key Interferon.

În Europa, în afară de laboratoarele Searle din Marea Britanie, celelalte centre de producere a interferonului erau cele ale Universității din Louvin, în Belgia, al Institutului Mérieux și al Societății Sanofi din Toulouse, Franța (producția scontată: 50 de miliarde de unități pe an), cel al concernului Hoechst din R. F. a Germaniei, cel al Societății Kabi Vitrum AB din Suedia. Ungaria urma să construiască, în 1982, un mare laborator pentru a produce interferon fibroblastic.

În Israel, societatea Inter-Yeda, susținută de filiala de cercetare și dezvoltare a Institutului Weizmann (The Yeda Research and Development Company) și care a fost creată cu concursul unei mari societăți italo-suedeze, a încheiat în 1982, un acord cu creditorii americani pentru instalarea unei uzine la Rehovot, a cărei producție de interferon fibroblastic urma să fie comercializată în 1984. Investiția se ridica la 5 milioane de dolari și Ministerul Industriei a acordat o subvenție egală cu această sumă, în cadrul politicii sale de încurajare a bioindustriei israeliene. Cercetătorii Institutului Weizmann, în cooperare cu medicii de la Centrul medical din Sheba, au arătat, în urma testelor făcute pe 50 de pacienți, că interferonul vindecă keratoconjunctivita cu adenovirus în 7 zile, față de tratamentul cu medicamentele antivirale curente care dura 25 de zile. Administrarea de interferon reducea astfel considerabil incidența keratitei care este o ulcerație a corneei, asociată adesea keratoconjunctivitei (într-un caz determinat, vindecarea se obține după 5 zile).

Interferonul γ sau interferonul imun este produs de celulele T ale sistemului limfatic. Producerea sa putea fi stimulată prin inductoare variate ca proteina (enterotoxina) A a stafilococilor (la Universitatea din Texas, în Galveston, Georgiades stimula astfel culturi de limfocite ale canalului toracic și obținea o mie de unități pe un milion de celule), serul antilimfocitar (Falcoff, Institutul Curie, Paris), fitohemaglutinina sau concanavalina A (Kirchner, 1981).

Laboratoarele Wellcome din Marea Britanie, produceau interferon γ plecînd de la culturi de celule limfoblastoide provenite de la hamsteri nounăscuți. Volumul de cultură (inițial de 1 000 l) era acum de 8 000 l.

În S.U.A. societatea Immuno Modulators Laboratories (IML) a produs 10 miliarde de unități pe lună de interferon γ pornind de la culturile de lim-

focite stimulate cu un agent mitogen. Societatea Interferon Science Inc. (din New Brunswick, New Jersey) producea un miliard de unități pe zi în 1982 și se angajase să livreze, în interval de 15 luni, firmei japoneze Green Cross Corporation, interferoni α și γ ultrapuri pentru suma totală de 2 200 000 de dolari. Laboratoarele Meloy (filiala Revlon Industries) instalate la Springfield, în Virginia, au încheiat un contract de 270 000 de dolari cu National Cancer Institute din S.U.A. în vederea extracției și purificării de interferon γ din limfocite de sînge uman; la sfîrșitul lui septembrie 1982, urmau să fie produse 5 miliarde de unități de interferon γ ori echivalentul a 1 000 de doze de tratament.

În general, tehnicile de producere a celor trei tipuri de interferon cu ajutorul leucocitelor, al celulelor limfoblastoide, al fibroblastelor și al limfocitelor au un randament mic și se caracterizează printr-un preț de cost ridicat al produsului obținut (prețul de cost industrial egal cu cel puțin 40—50 de dolari milionul de unități) și printr-o puritate insuficientă (chiar dacă acesta a depășit 0,1—10%, ajungînd pînă la 10—50% în cazul interferonului limfoblastic). De aceea se așteaptă mult de la metodele de producere a interferonului care foloseau tehnicile de recombinare genetică.

Biosinteza cu ajutorul microorganismelor cu genom modificat

În ianuarie 1980 Gilbert și Weissmann, la Boston, făceau cunoscut faptul că reușiseră să producă interferon uman cu ajutorul unor colibacili cu genomul modificat. Cei doi cercetători făceau parte din Societatea Biogen ai cărei specialiști (Weissmann și Nagata, Taira, Hall, Johnsrud, Streuli, Ecsödi și Boll), în colaborare cu Cantell (Laboratorul central de sănătate publică din Helsinki), au fost primii care realizau această biosinteză. Dificultatea inițială era raritatea ARN-mesager al interferonului α, chiar și în leucocitele stimulate de un virus.

ARN-ul mesager extras din leucocite (27 de litri la fiecare experiență) servea la fabricarea ADN-ului copie, care era legat de o plasmidă și clonat prin tehnicile obișnuite. Acești cercetători, examinînd în jur de 20 000 de cloni, au realizat hibridarea între ADN-ul plasmidei clonilor și ARN-ul mesager al leucocitelor, au izolat ARN-ul corespondent și au verificat dacă acesta din urmă era capabil să comande sinteza interferonului, nu în preparate „in vitro", ci în ovocite de broască (cantitatea de interferon sintetizată era suficientă pentru a proteja ovocitul de anumite afecțiuni virale). Weissmann colaboratorii săi au constatat apoi că anumiți cloni de colibacili, care conțineau ADN-ul interferonului leucocitar, sintetizează această substanță în cantități infime: 1—2 molecule pe celulă (proteinele bacteriene sînt în general sintetizate în proporție de 1 000 la 100 000 de molecule pe celulă).

În iulie 1980 un grup de cercetători de la Institutul japonez al cancerului, condus de Taniguchi, a obținut interferon fibroblastic printr-un procedeu analog, dar cu un randament superior celui obținut de cercetătorii de la Biogen: aproape 100 de molecule din această substanță puteau fi extrase dintr-o celulă de colibacil și, după Taniguchi, biosinteza putea produce în jur de 10 000 de molecule pe celulă bacteriană. De fapt cercetătorii japonezi, încă din noiem-

brie 1979, elaboraseră plasmide hibride conținînd ADN-ul unui interferon fibroblastic (Taniguchi ș.a., 1980).

Un al treilea grup de cercetători, condus de Revel la Institutul Weizmann și de Tiollais la Institutul Pasteur din Paris, au obținut același rezultat: celule de colibacil cu genomul modificat sintetizaseră, de asemenea, interferon fibroblastic în cantități foarte mici.

O etapă importantă a acestei „curse" a interferonului urma să o constituie, în 1980, elucidarea secvențelor nucleotidice ale genelor interferonilor leucocitar (IFN-α) și fibroblastic (IFN-β). Taniguchi ș.a. (Tokyo), Houghton ș.a. (laboratorele Searle, în High Wycombe, din Marea Britanie) și Derynck ș.a. (Universitatea din Gand și Institutul Rega de cercetare medicală al Universității catolice din Louvain) au determinat secvența genei interferonului fibroblastic, în timp ce Weissmann ș.a. și Mantei ș.a. au elucidat-o pe cea a genei interferonului leucocitar.

ARN-ul mesager al interferonului fibroblastic conține 836 de nucleotide, dintre care nucleotidul 72 și nucleotidul 203 corespund regiunilor 5′, respectiv 3′, și nu sînt traduse; 63 de nucleotide determină sinteza unui peptid indispensabil secretării proteinei și 498 de nucleotide guvernează sinteza a 166 de aminoacizi. Molecula protidică corespondentă are o greutate moleculară de 20 000 de daltoni și este vorba de o glucoproteină.

ARN-ul mesager al interferonului leucocitar conține 865 de nucleotide, dintre care 242 se află în regiunea 3′ netradusă. Se regăsește aici și o regiune care codifică pentru un peptid de 23 de aminoacizi, urmată de o regiune conținînd 498 de nucleotide și determinînd sinteza a 166 de aminoacizi.

Acești doi interferoni prezentau o structură destul de asemănătoare, și Weissmann a făcut o comunicare în legătură cu acest subiect la un colocviu internațional asupra chimiei și biologiei interferonilor (organizat în California, în martie 1982). După opinia acestui cercetător de la Universitatea din Zürich, la om există 15 gene diferite răspunzătoare de sinteza interferonilor α. El a reușit să cloneze interferonul α al șoarecelui și, după părerea lui, genele interferonilor α și β ar fi devenit divergente acum aproape 400 000 000 de ani, în timp ce genele interferonilor α ai omului și șoarecelui — în urmă cu 70 000 000 de ani.

Derynck ș.a. (1980) au elaborat plasmide hibride conținînd ADN-ul copie al unui interferon fibroblastic și au constatat că expresia acestui ADN în celulele colibacilului era funcție de orientarea sa corectă și de inducție a transcripției sale cu ajutorul unui promotor al bacteriofagului λ. Testele fizico-chimice, biologice și imunologice efectuate asupra proteinelor obținute au dus la concluzia că interferonul biosintetic este identic cu cel produs de fibroblaste. Randamentul era totuși mic: în jur de 100 de molecule la 5×10^8 celule pe mililitru. Cu toate acestea Derynck și colaboratorii săi sperau să amelioreze aceste randamente elaborînd plasmide cu eficiență superioară.

În martie 1981, cercetătorii secției de genetică a Universității de Stat din Washington, în Seattle, au făcut cunoscut faptul că reușiseră, în colaborare cu cercetătorii societății Genentech (California), să producă interferon leucocitar cu ajutorul unor celule de drojdie cu genom modificat. Era prima oară cînd o proteină umană era sintetizată de celule de drojdie. Într-adevăr, Hitzeman, Hagie, Levine și Goeddel (Genentech) și Ammerer și Hall (Secția de genetică a Universității de Stat din Washington) (1981) au introdus în celulele de *Saccharomyces cerevisiae* ADN-ul corespondent unui interferon leucocitar

uman (LeI-D), după ce l-au asociat genei alcool-dehidrogenazei a unei drojdii într-o plasmidă în stare să se replice în mod autonom și în cele de *Escherichia coli*. Expresia optimă a ADN-ului interferonului leucocitar se obținea prin înlocuirea regiunii promotorului 5' cu cea a genei alcool-dehidrogenazei, apoi prin contopirea celor două gene în sînul plasmidei. Celulele de drojdie produceau pînă la 10 molecule de interferon leucocitar per celulă; o asemenea producție era socotită a fi importantă pentru experiențele preliminare și era o dovadă a stabilității interferonului în celulele de drojdie. Directorul secției de genetică (B. Hall) a Universității de Stat din Washington, ale cărei cercetări asupra geneticii drojdiei începuseră încă din 1950, considera că tehnicile de producere a interferonului puteau fi îmbunătățite de zece ori utilizînd drojdii în loc de bacterii. *Saccharomyces cerevisiae* prezintă, într-adevăr, un avantaj deosebit pentru sinteza glucoproteinelor de organisme superioare (este cazul interferonilor), deoarece adiția grupării ozidice se realizează aici prin același mecanism ca în cazul celulelor animale.

Cei care au reușit să cîștige cursa angajată între mai multe grupuri de cercetători pentru clonarea ADN-ului corespunzător interferonului γ au fost tot specialiștii societății Genentech. La al doilea congres internațional de cercetare asupra interferonului, care a avut loc la San Francisco la sfîrșitul lunii octombrie 1981, Goeddel a adus la cunoștință faptul că împreună cu colaboratorii săi de la Genentech nu numai că au determinat secvența ADN-ului interferonului dar și faptul că bacterii, drojdii și celule de mamifere sînt capabile să producă acest tip de interferon după ce își integrează genomului lor ADN-ul corespondent. Cercetătorii de la Genentech au izolat din limfocite umane molecule de ARN mesager, apoi au fabricat moleculele de ADN-copie corespunzătoare și le-au introdus pe acestea în celule de *Escherichia coli*. Bacteriile producătoare de interferon imun au fost izolate, ținînd cont de instabilitatea în mediu acid (pH=2) a interferonului γ (spre deosebire de interferonii α și β mai stabili). Randamentele obținute de Goeddel erau următoarele: un litru de cultură bacteriană *(E. coli)* producea 25 de mii de unități de interferon; un litru de cultură de celule de drojdie *(S. cerevisiae)* producea un milion de unități de interferon și un litru de cultură de celule de maimuță producea 100 000 de unități de interferon γ.

Secvența nucleotidică a ADN-ului interferonului α era diferită de cea a ADN-ului interferonilor α, dar lungimea lor era asemănătoare. În timp ce genele interferonilor α și β nu conțineau introni (ceea ce explica expresia lor imediată în celulele bacteriene), gena interferonului γ avea trei introni și patru exoni și se afla pe cromozomul 12. După exemplul altor cercetători (Weissmann la Biogen, Vilcek la New York University School of Medecine și Hood la California Institute of Technology), cercetătorii de la Genentech încercau să afle dacă există mai multe varietăți de interferon γ, ca în cazul interferonilor α (Newmark, 1981 b).

În aprilie 1982, Falcoff și colaboratorii săi (Laboratorul de cercetări asupra interferonului INSERUM U196 — Institutul Curie, Paris) urmau, la rîndul lor, în colaborare cu cercetătorii societății Transgène, din Strasbourg, și ai companiei farmaceutice Roussel-Uclaf, să izoleze și să cloneze gena interferonului γ în ovocitele de broască. Clonarea acestei gene în celulele bacteriene sau în culturile celulare reprezenta următoarea etapă înainte de realizarea producției de interferon în cantități mai însemnate.

În Japonia, cercetătorii firmei Suntory au reușit, în iunie 1982, să cloneze gena interferonului γ în celulele de *Escherichia coli*. Anterior, ei efectuaseră sinteza manuală a genei acestui interferon fără intronii săi (secvențe nucleotidice care nu codează).

O etapă importantă în vederea producerii unor cantități suficiente de interferon a avut loc în august 1982, cînd un grup de nouă cercetători britanici din secția farmaceutică aparținînd de Imperial Chemical Industries (ICI) și de Facultatea de Științe Biologice a Universității din Leicester (Edge ș.a., 1981) au publicat rezultatele lucrărilor lor avînd ca obiect sinteza completă a unei gene de interferon leucocitar al omului. Începute cu un an și jumătate înainte, lucrările cercetătorilor britanici veneau după determinarea secvențelor nucleodice ale ADN-ului (genelor) responsabile de sinteza interferonilor obținuți pornind de la ARN mesageri corespondenți, datorită activității transcriptazei inverse. Pornind de la secvența nucleotidică a ADN-ului-copie corespunzînd interferonului leucocitar (IFN-α_1), publicată de Weissmann și colaboratorii săi în 1980, cercetătorii britanici au realizat sinteza completă a unui ADN identic capabil să determine producerea de interferon α_1.

O sinteză asemănătoare s-a realizat și în cazul genelor somatostatinei (Itakura, 1977), a celor două lanțuri ale insulinei (Goeddel ș.a., 1979) și a N^{α}-dezacetil-timozina α_1 (Wetzel ș.a., 1980). Dar Interferonul α_1 era o moleculă de mari dimensiuni (166 de aminoacizi) și gena corespunzătoare era cea mai lungă genă sintetizată pînă atunci, de vreme ce conținea 514 nucleotide; întrucît cele două capete complementare de ADN trebuiau sintetizate simultan, Edge ș.a. (1981) au asamblat peste 1 000 de nucleotide.

Originalitatea lucrărilor întreprinse de cercetătorii britanici a constat în faptul că au utilizat o nouă tehnică de sinteză, care permite o creștere considerabilă a vitezei de fabricare a genei. La început se atașează un nucleotid la o rășină poliacrilamidă, apoi se fixează succesiv perechi de nucleotide, datorită unui agent de cuplaj, în piridină anhidră; timpul necesar fiecărui ciclu este de o oră și jumătate. La această viteză puteau fi asamblate 5 000 de nucleotide într-un an. Cercetătorii britanici au fabricat 67 de segmente nucleotidice care, reunite în mai multe etape de o ligază specifică, au format un capăt dublu de ADN compus din 514 nucleotide. Procedînd astfel, ei nu au depășit pentru sintetizarea unei gene timpul necesar pentru izolarea materialului genetic pornind de la celule.

Într-un articol apărut în „Proceedings of the National Academy of Science" (vol. 79, nr. 14, 1982) și semnat de către de Maeyer și de zece cercetători de la Institutul Curie (Orsay, France) de la Spitalul de copii (Ontario, Canada), de la Universitatea din Leicester și de la grupul de cercetare aparținînd firmei Imperial Chemical Industries, a fost adusă dovada expresiei acestei gene sintetice. După ce a fost unită cu o plasmidă, gena a fost introdusă în două bacterii, *Escherichia coli* și *Methylophilus methylotrophus*. Acesta din urmă este un microorganism cultivat pe un mediu conținînd metanol în scopul producerii de biomasă protidică într-o uzină a ICI (v. pag. 175); el pare să prezinte avantaje economice și calitatea de a fi nevătămător în raport cu colibacilul, în perspectiva unei producții industriale a interferonului. După cum consideră de Maeyer ș.a., produsul sintetizat de cele două specii bacteriene cu genom modificat are proprietăți biologice identice cu cele ale interferonului α_1 natural.

Făcînd demonstrația expresiei și efectelor biologice ale genei sintetizate de cercetătorii Universității din Leicester, echipa lui de Maeyer confirma turul de forță tehnică pe care îl reprezintă această sinteză. Ea putea fi punctul de plecare al unei serii de experiențe constînd în modificarea structurii moleculelor de interferon, acționînd asupra structurii genei. Ar fi atunci posibil să cunoaștem mai bine funcțiile diferitelor părți ale acestor molecule „hibride" compuse din elemente care provin din doi sau mai mulți interferoni. Reușita tehnică a cercetătorilor britanici ar trebui să deschidă calea unui cîmp vast de exeprienţe, nu numai pentru a spori eficacitatea diverselor tipuri de interferon (α, β și γ) și pentru ameliorarea producției, ci și pentru a elucida natura raporturilor dintre structurile moleculare și funcțiile fiziologice.

Tehnicile de recombinare genetică au fost utilizate de mai multe instituții de cercetare și firme industriale pentru producerea diverselor tipuri de interferon: în S.U.A., Biogen (în colaborare cu Schering-Plough, α_2), Cetus (în colaborare cu Shell, β), Collaborative Genetics (în colaborare cu Interferon Science Inc., β, celule de drojdie), Genentech (α, β și γ, *E. coli* și drojdie), Hoffmann — La Roche (α și β-Genentech, drepturi exclusive de comercializare în S.U.A.); în Japonia, Daichi Seiyaku (γ-Genentech, în exclusivitate în Japonia) Kyowa Hakko Kogyo (β), Mitsui Toatsu Chemical (în colaborare cu Genentech), Toray Industries (β și γ) în colaborare cu Genentech); în Franța Institutul Pasteur (β), Transgène (γ); în Marea Britanie, Searle (β), în Suedia, Kabigen AB (α și β, *E. coli*); în Israel, Institutul Weizmann (β).

Pe de altă parte a fost realizată în cîteva laboratoare purificarea interferonilor, care era indispensabilă atît pentru determinarea structurii moleculelor cît și pentru bunul mers al testelor clinice. La Roche Institute of Molecular Biology (New Jersey), Pestka, cel care purificase interferonul obținut din serul unor bolnavi atinși de leucemie mieloidă cronică, a reușit, dupăexemplul lui Weissmann și colaboratorii săi, să cristalizeze interferonul leucocitar obținut prin recombinare genetică (Friedman ș.a., 1982). Structura terțiară a proteinei rămînea de stabilit prin tehnicile de difracție cu raze X, dar bazîndu-se pe localizarea reziduurilor de aminoacizi hidrofili și hidrofobi, Wetzel (de la Genentech) a estimat că interferonul leucocitar este o proteină globulară cu un nucleu hidrofob, din care mai mult de 65% se prezenta sub formă de helix α reunite prin structuri β. Wetzel și Pestka au semnalat faptul că ultimii 11 aminoacizi ai moleculei de interferon leucocitar obținut prin recombinare genetică nu sînt indispensabili acțiunii lui antivirale. Pestka și colaboratorii săi au izolat, de altfel, trei interferoni naturali care nu aveau decît 55 de aminoacizi, în timp ce majoritatea moleculelor aveau, în general, 165 sau 166 de aminoacizi (Friedman ș.a. 1982). În ceea ce privește interferonul γ natural, acesta a fost purificat de Vilcek (New York University School of Medicine), care a constatat existența a două forme cu greutatea moleculară de 20 000 și respectiv 25 000. Cu molecule marcate de I^{125}, Vilcek a putut demonstra că receptorii interferonului uman și fibroblastic erau identici dar că ei se deosebeau de cei ai interferonului leucocitar (Friedman ș.a., 1982).

În concluzie, eforturile depuse pentru obținerea biosintezei interferonilor cu ajutorul microorganismelor cu genom modificat și pentru producerea lor la un cost care ar fi poate de o sută de ori mai mic decît costul tehnicilor de culturi de celule, nu au împiedicat, totuși, lucrările relative la ameliorarea acestora din urmă în scopul obținerii unor cantități indispensabile testelor clinice și terapeutice. Va trebui să se consacre un timp destul de lung testelor

de securitate necesare înainte de comercializarea interferonilor produși de microorganisme. Pe de altă parte, varietatea interferonilor impune cercetări fiziologice și clinice destinate diferențierii diverselor tipuri, astfel încît o producție și o comercializare pe scară largă nu ar putea fi proiectate înainte de 1985 sau 1990. Tabelul 2 recapitulează atît diferitele tehnici de producere a interferonilor, cît și starea avansării testelor clinice și previziunile relative la comercializarea lor.

Tabelul 2. **Tehnici de producere a interferonilor leucocitar, fibroblastic și imun, stadiul testelor clinice și previziuni relative la comercializarea lui (după Yanchinski, 1980)**

Tehnici de producere a interferonului	Celule utilizate	Teste clinice și producția pe scară largă	Previziuni asupra comercializării
Culturi celulare	Leucocite provenind din sînge donat	Producția pe scară largă se lovește de faptul că leucocitele nu se înmulțesc în cultură. Teste clinice în curs	3—5 ani
	Limfocite transformate (celule limfoblastoide)	Cînd sînt cancerizate, limfocitele se multiplică în cultură și pot, așadar, să se preteze producerii interferonului pe scară largă	
	Fibroblaștii	Fibroblaștii, care se multiplică în cultură, se potrivesc producerii interferonului pe scară largă Teste clinice în curs	
Recombinare genetică	Colibacili sau levuri	Producerea pe scară largă este posibilă Teste clinice în 1981 și 1982	5—10 ani

Teste clinice și terapeutice cu interferoni

Evaluarea proprietăților anticanceroase sau antivirale ale interferonului presupune un protocol diferit de cel obișnuit, din două motive: primul se referă la cantitățile foarte mici disponibile din această substanță; al doilea ține de specificitatea interferonului, lucru care face absolut necesară aplicarea testelor clinice asupra omului, deoarece testele pe animalele de laborator nu ar prezenta prea mare interes. Sporirea cantităților disponibile nu a fost urmată întotdeauna de realizarea testelor clinice și terapeutice riguroase, comportînd toate măsurile de securitate și dovezile indispensabile.

Printre testele efectuate în cele mai bune condiții, trebuie citate cele făcute de American Cancer Society, care utiliza interferonul leucocitar (amestec de interferoni α), furnizat de laboratoarele finlandeze. Aceste teste aveau ca obiect cancere avansate ale sînului. Teste analoage cu același tip de interferon au fost efectuate la Spitalul MD. Anderson, din Houston. Dintr-un total de 43 de cazuri, 12 au prezentat o reducere de cel puțin 50% a diametrelor tumorilor; pentru alte 6 cazuri reacția a fost mai puțin importantă în urma tratamentului. Testele terapeutice efectuate de American Cancer Society

de securitate necesare înainte de comercializarea interferonilor produși de microorganisme. Pe de altă parte, varietatea interferonilor impune cercetări fiziologice și clinice destinate diferențierii diverselor tipuri, astfel încît o producție și o comercializare pe scară largă nu ar putea fi proiectate înainte de 1985 sau 1990. Tabelul 2 recapitulează atît diferitele tehnici de producere a interferonilor, cît și starea avansării testelor clinice și previziunile relative la comercializarea lor.

Tabelul 2. **Tehnici de producere a interferonilor leucocitar, fibroblastic și imun, stadiul testelor clinice și previziuni relative la comercializarea lui (după Yanchinski, 1980)**

Tehnici de producere a interferonului	Celule utilizate	Teste clinice și producția pe scară largă	Previziuni asupra comercializării
Culturi celulare	Leucocite provenind din sînge donat	Producția pe scară largă se lovește de faptul că leucocitele nu se înmulțesc în cultură. Teste clinice în curs	3—5 ani
	Limfocite transformate (celule limfoblastoide)	Cînd sînt cancerizate, limfocitele se multiplică în cultură și pot, așadar, să se preteze producerii interferonului pe scară largă	
	Fibroblaștii	Fibroblaștii, care se multiplică în cultură, se potrivesc producerii interferonului pe scară largă Teste clinice în curs	
Recombinare genetică	Colibacili sau levuri	Producerea pe scară largă este posibilă Teste clinice în 1981 și 1982	5—10 ani

Teste clinice și terapeutice cu interferoni

Evaluarea proprietăților anticanceroase sau antivirale ale interferonului presupune un protocol diferit de cel obișnuit, din două motive: primul se referă la cantitățile foarte mici disponibile din această substanță; al doilea ține de specificitatea interferonului, lucru care face absolut necesară aplicarea testelor clinice asupra omului, deoarece testele pe animalele de laborator nu ar prezenta prea mare interes. Sporirea cantităților disponibile nu a fost urmată întotdeauna de realizarea testelor clinice și terapeutice riguroase, comportînd toate măsurile de securitate și dovezile indispensabile.

Printre testele efectuate în cele mai bune condiții, trebuie citate cele făcute de American Cancer Society, care utiliza interferonul leucocitar (amestec de interferoni α), furnizat de laboratoarele finlandeze. Aceste teste aveau ca obiect cancere avansate ale sînului. Teste analoage cu același tip de interferon au fost efectuate la Spitalul MD. Anderson, din Houston. Dintr-un total de 43 de cazuri, 12 au prezentat o reducere de cel puțin 50% a diametrelor tumorilor; pentru alte 6 cazuri reacția a fost mai puțin importantă în urma tratamentului. Testele terapeutice efectuate de American Cancer Society

în cazul melanoamelor au dat rezultate şi mai puţin încurajatoare: din 43 de cazuri, un singur caz a reacţionat favorabil şi alte cinci într-un mod nu foarte semnificativ. În sfîrşit, din 23 de bolnavi atinşi de mielom multiplu, numai patru au cunoscut o ameliorare. În urma acestor rezultate, American Cancer Society a utilizat interferonul în combinaţie cu alţi agenţi anticanceroşi. În cazul cancerului de sîn, rezultatele au arătat că interferonul poate fi tot atît de eficace ca oricare altă substanţă terapeutică, dar, probabil, mai puţin eficace decît combinaţia mai multor medicamente anticanceroase.

National Cancer Institute a realizat, în 1981, teste clinice cu interferon leucocitar în trei centre şi cu interferon limfoblastic în alte două centre. Rezultatele obţinute în faza I a testelor terapeutice cu interferonul α_2 obţinut prin recombinare genetică şi cu interferonul limfoblastic au dovedit existenţa unei acţiuni antitumorale a celor două substanţe împotriva mai multor cancere umane (Friedman ş.a., 1982).

La 16 ianuarie 1981, o echipă medicală de la Universitatea din Texas, sub direcţia unui medic cancerolog, J. Gutterman, a anunţat, la Houston, utilizarea, la persoane atinse de cancere, de interferon leucocitar obţinut prin recombinare genetică de firmele Genentech şi Hoffmann-La Roche, în cadrul unui protocol terapeutic restrîns. Era vorba de o premieră mondială, care demonstra, după cazul insulinei şi al somatostatinei, că timpul care desparte producerea prin inginerie genetică a substanţei biologice active, de experimentarea umană, devine tot mai scurt. Echipa texană, după modelul altor echipe medicale din lume a pus la punct, în 1979, un protocol experimental cu interferonul leucocitar obţinut pornind de la culturi de celule. Pentru noul test, Gutterman proiectase o primă fază experimentală de 4—6 luni, pentru a observa la cei opt bolnavi voluntari reacţii secundare provocate de injecţiile repetate cu substanţa respectivă şi pentru a determina dozele eficace. Cei opt voluntari, dintre care o tînără atinsă de un cancer al sistemului limfatic, urmau să primească numai interferon biosintetic, cu excluderea oricărei alte substanţe terapeutice cu efecte deja cunoscute. Această experienţă nu a fost realizată nici cu concursul lui National Cancer Institute şi nici în colaborare cu Food and Drug Administration; doar Human Surveillance Committee a supravegheat ca imperativele etice să fie respectate. O asemenea experienţă a fost totuşi criticată, deoarece, după opinia anumitor specialişti, problemele etice apărute au fost grave şi încercarea echipei americane părea o aventură (v. pag. 261).

În schimb, testele terapeutice întreprinse la 9 februarie 1982 de Gutterman la Spitalul MD. Anderson, din Houston, cu interferon care era furnizat de laboratoarele Meloy, au primit acordul de la Food and Drug Administration. În 1982, Gutterman a făcut pe de altă parte cunoscut faptul că din 19 bolnavi atinşi de cancer renal şapte se simţeau mai bine după un tratament cu interferon (Friedman ş.a., 1982).

La reuniunea anuală a Societăţii americane de oncologie clinică (American Society of Clinical Oncology), care s-a ţinut la St. Louis în aprilie 1982, National Cancer Institute a pus în circulaţie lista testelor terapeutice realizate în S.U.A. cu diverse tipuri de interferoni. Testele precoce efectuate cu substanţe naturale se refereau la interferonii β şi γ, iar cele avansate (faza a II-a) bazate pe interferonul α utilizau produse sintetizate prin recombinare genetică. Puritatea din ce în ce mai mare a preparatelor de interferon utilizate în testele clinice şi terapeutice a fost una dintre condiţiile impuse de Food and

Drug Administration pentru autorizarea acestor teste. Chiar dacă, după părerea specialiștilor americani, rămîneau de făcut lucrări importante cu interferonii produși pornind de la celule sanguine și fibroblaste, totuși părea evident că tehnicile de producere a interferonului biosintetic prin recombinare genetică trebuiau să aibă un loc predominant și să se afle în centrul unei concurențe foarte puternice între firmele care furnizează interferonii serviciilor spitalicești.

În Suedia, societatea Kabi Vitrum AB și laboratoarele universitare își continuau cercetările asupra interferonilor umani începînd din 1968 și, cu filiala sa Kabigen AB (specializată în inginerie genetică), din 1979. Încercările terapeutice începuseră din 1971 cu interferon leucocitar obținut prin metoda Cantell, folosindu-se 3 600 000 de unități pe lună. O serie de teste realizate, în 1980, la Spitalul Karolinska, pe 50 de cazuri de osteosarcom, cu interferon leucocitar au fost conduse mulțumitor în plan experimental și rezultatele păreau să indice o superioritate a interferonului în raport cu substanțele terapeutice clasice. În Marea Britanie s-au cheltuit 1 milion de lire pentru efectuarea unui test pe 80 de pacienți, și pe 4 tumori diferite. Au fost luate măsuri pentru desfășurarea testelor astfel încît să fie obținute rezultate rapide și bolnavii să nu fie privați de tratamentele obișnuite. Alte teste clinice au fost efectuate pe plan mondial și au avut ca obiect mai puțin de 10 bolnavi, cu excepția unui test cu interferon fibroblastic realizat pe 26 de cazuri de neuroblastom, la Universitatea din Tübingen.

În Franța, cîțiva medici de la Spitalul Saint-Louis, din Paris, au făcut, în septembrie 1982, un bilanț al primelor teste de tratament al cancerelor cu ajutorul interferonilor semipurificați și au ajuns la concluzia că aceștia din urmă prezintă, indiscutabil, o activitate antitumorală în cazurile studiate (leucemii acute, leucemii limfoide cronice, limfomi nehodkinieni, cancere ale sînului și osteosarcoame). Dar au constatat că în toate cazurile rezultatele obținute păreau mai slabe decît în cazul unei polichimioterapii anticanceroase clasice. Reacțiile secundare (oboseală, febră, inapetență, distrugerea celulelor sanguine) nu erau considerate „dramatice". Medicii francezi estimau că aceste rezultate preliminare trebuiau să conducă la realizarea altor teste cu interferoni mai specifici, cu un grad înalt de purificare și mai bine dozați.

În China, un test de tratament cu interferon α a fost efectuat în cazul unui carcinom nazofaringian în faza a II-a, la Spitalul popular al regiunii autonome Guang-Xi, la Nanning, în colaborare cu laboratorul de epidemiologie și imunovirusologie al Facultății de medicină Alexis-Carrel din Lyon I, Institutul de cercetări asupra cancerului Gustave-Roussy din Villejuif, Franța, și Laboratorul de Sănătate Publică din Helsinki. Treizeci de pacienți au primit cobaltoterapie fie autonomă, fie precedată de administrarea de interferon leucocitar furnizat de Cantell (Helsinki). Administrarea aceasta consta în injecția intramusculară zilnică a 3 milioane U.I. de interferon timp de 5 săptămîni, urmată de o injecție trihebdomadară timp de 4 săptămîni, deci un total de 150 de milioane U.I. de interferon. Între sfîrșitul tratamentului și iradiere (7 000 razi în regiunea cervicală) exista o săptămînă de repaus. În aprilie 1982, s-au constatat trei regresii clare care au persistat vreme de mai multe săptămîni, cît și două regresii în cele cinci cazuri de metastaze limfatice cervicale. Biopsiile au permis observarea unui proces degenerativ sau o necroză a celulelor canceroase. În viitor trebuie folosite doze mai ridicate de interferon pentru ameliorarea rezultatelor obținute.

În Japonia, teste clinice au fost efectuate de la sfîrșitul anului 1981 cu interferon leucocitar, produs de Hoffmann — La Roche și Takeda Chemical Industries, în timp ce în Franța, la Institutul Pasteur și Institutul Național al Sănătății și Cercetării Medicale (INSERM) urmau să fie făcute teste pentru examinarea proprietăților antileucemice ale interferonului produs de societatea japoneză Hayashibara Biochemical Laboratories Inc., care trebuiau să furnizeze celor două instituții franceze, în acest scop, 50 de miliarde de unități de interferon. Firmele Kyowa Hakko Kogyo și Toray Industries au obținut, la 24 august 1981, drepturile de exploatare a tehnicienilor de producție de masă puse la punct de Cancer Research Laboratory din Japonia, pentru fabricarea interferonului fibroblastic biosintetic. Cu acest interferon urmau să fie făcute teste de tratament antitumoral în 1982.

Biosinteza interferonului γ cu ajutorul bacteriilor cu genom modificat (v. p. 44) făcuse să se nască speranța în posibilitatea dispunerii de un agent anticanceros mai puternic decît ceilalți interferoni, deoarece acțiunea antitumorală a acestui interferon părea să se desfășoare prin mijlocirea sistemului imunitar, din cauză că interferonul γ era produs de celule ale acestui sistem și acționa asupra lor. Acțiunea anticanceroasă a interferonului ar putea într-adevăr să se explice prin stimularea sistemului de apărare naturală a organismului, în special a limfocitelor capabile să distrugă celulele canceroase și pe cele care produc anticorpi. Ea ar putea să rezulte, de asemenea, dintr-un efect direct asupra creșterii celulare și asupra reglării ei.

Dacă efectele secundare ar putea fi eliminate, doze mai ridicate decît cele utilizate în testele clinice din 1981 (10^6 unități pe zi în timpul primelor 30 de zile de tratament) ar putea face să crească eficacitatea interferonilor; unor bolnavi le-au fost administrate, în mod repetat, doze de $100 \cdot 10^6$ unități și acestea au fost bine tolerate. Studiile întreprinse la Imperial Cancer Research Fund, în Marea Britanie, pe baza interferonilor leucocitari, și la Universitatea Stanford, în California, cu interferon α_2, sintetizat de bacterii, au demonstrat că pacienții pot suporta doze de interferon de 20 de ori mai mari decît cele utilizate în testele anterioare, chiar dacă doar pe o perioadă scurtă. Dar nu este cunoscută durata unui astfel de tratament și poate că este preferabil să se utilizeze doze mai mici pe perioade mai lungi pentru a stimula mai bine sistemul de apărare naturală a organismului. Testele clinice efectuate la Universitatea Stanford au demonstrat că interferonul α_2 de origine bacteriană prezintă o activitate antitumorală și efecte secundare foarte apropiate de cele ale amestecului de interferoni α ai leucocitelor. Dar unii bolnavi au produs anticorpi împotriva interferonului α_2, ceea ce putea să producă o reducere serioasă a efectului terapeutic. O observație asemănătoare a fost făcută în cazul unui pacient căruia i se administrase interferon fibroblastic (Balkwell, 1982).

Numărul mic de canceroși tratați în acest mod în lume (1980—1982), puritatea insuficientă a produsului utilizat, faptul că există sensibilități individuale determinate genetic, la acțiunea lui (cum a arătat de Maeyer, la Institutul Curie-Orsay, Franța) ar explica poate un bilanț provizoriu relativ modest.

A fost la fel de dificil să se tragă niște concluzii clare în urma testelor efectuate asupra proprietăților antivirale ale interferonului, chiar dacă, după Cantell, un tratament de rutină al keratitei herpetice și al papilomului laringian al copilului ar putea fi proiectat. Cercetători de la universătățile din

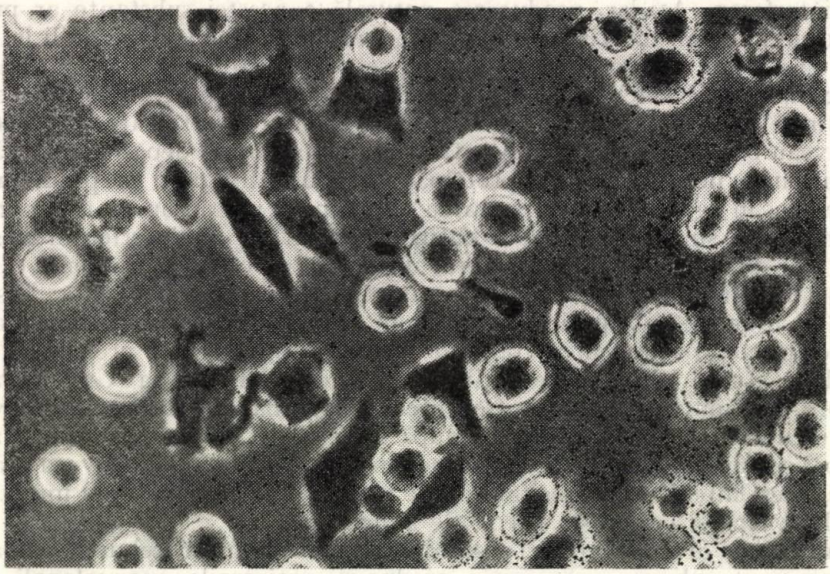
Freiburg și Utrecht au constatat totuși că trifluorotimidina, asociată cu interferonul, este mai eficace în tratarea keratitei herpetice decît trifluorotimidina.

O încercare de tratare a papilomului laringian al unui copil (tumoare benignă, dar recidivantă, datorată unui papilomavirus), realizată în 1981 la Stockholm, cu interferon leucocitar obținut prin metoda lui Cantell, a dat rezultate excelente.

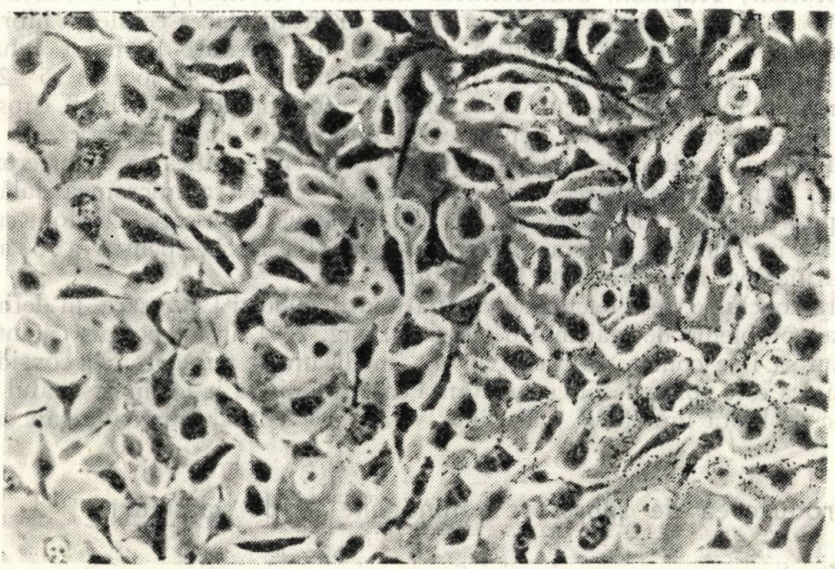
De remarcat faptul că interferonii nu acționează direct asupra virusurilor, ci asupra celulelor-gazdă ale acestora. Celulele tratate cu interferon produceau cel puțin șase noi proteine, dintre care două au fost identificate și afectau ciclul de dezvoltare a virusurilor: unele virusuri erau inhibate imediat după pătrunderea lor în celula-gazdă, altele se înmulțeau aici, dar nu puteau să iasă și să infecteze celule neatinse (Balkwell, 1982). Interferonul ar putea bloca gena timidin-kinazei, enzimă indispensabilă înmulțirii *in vitro* a virusului herpetic. Otsuka și colaboratorii săi (Baylor College of Medicine, Houston-Texas) au izolat și transferat această genă în celule animale de cultură. O formă mai puțin virulentă a virusului herpetic de maimuță s-a obținut prin eliminarea, cu ajutorul tehnicilor de recombinare genetică, a unei părți a genei timidin-kinazei. Ar putea fi astfel pus la punct un vaccin împotriva acestui virus care cauzează infecții bucale și genitale cronice la om și care rezistă la numeroase tratamente chimioterapeutice.

O serie de teste clinice asupra acțiunii interferonului împotriva sclerozei în plăci au fost realizate în S.U.A., sub egida lui National Multiple Sclerosis Society, asupra a 24 de pacienți, cu interferon leucocitar furnizat de Cantell (Laboratorul central de sănătate publică din Helsinki). Testele au fost efectuate la Universitatea Stanford (Palo Alto), la Universitatea din California (San Francisco) și la Scripps Clinic and Research Foundation (La Jolla). Rezultatele erau așteptate pentru începutul anului 1984. Un test terapeutic cu o durată de doi ani a fost efectuat, de asemenea, în secția de neurologie de la Dandery Hospital din Stockholm, în scopul cunoașterii acțiunii unui interferon leucocitar (purificat cu ajutorul anticorpilor monoclonali) asupra sclerozei în plăci. În noiembrie 1981, Dent Neurological Institute (Buffalo) a publicat rezultatele unui tratament cu interferon fibroblastic administrat pe cale intrarahidiană, care pare să reducă frecvența atacurilor.

După ce au stabilit, în 1972, eficacitatea interferonului leucocitar (obținut prin metoda Cantell) în tratarea guturaiului (rinovirus), cercetători de la Common Cold Unit (Medical Research Council, Marea Britanie) din Salisbury au reluat, la începutul anului 1982, testele clinice întrerupte cu zece ani în urmă din cauza prețului ridicat al interferonului. Această reluare se explica prin speranța de a vedea acest preț scăzînd ca urmare a producerii interferonului prin recombinare genetică. În aceste teste era folosită o substanță cu un grad de puritate mult mai mare decît cu zece ani în urmă și s-a constatat că împotriva rinovirusului erau eficace doze ridicate de interferon leucocitar sintetizat de bacterii cu genom modificat (Genentech și Hoffmann-La Roche) sau produs de leucocite. Experiențele făcute la Salisbury pe 180 de voluntari trebuiau, pe deasupra, să demonstreze în ce măsură era posibil să fie reduse aceste doze și să se întîrzie administrarea interferonului după începutul afecțiunii. Generalizarea utilizării unei astfel de substanțe în doze eficace era în funcție de prețul de vînzare al preparatelor farmaceutice.



Acțiunea interferonului.
O cultură de celule infectate de un virus și tratate anterior cu interferon.



Aceleași celule ca în fotografia anterioară, care nu au fost tratate cu interferon.
[Foto: E. Falcoff, Laboratorul de cercetări asupra interferonului. INSERM U 196, Institutul Curie, Paris. În: *Biofutur* (Paris), martie, 1982, p. 14].

Un tratament pe bază de interferon ar fi de preferat în mod special în cazul bolnavilor suferind de afecțiuni virale și incapabili să producă ei înșiși interferon. Așadar, producerea naturală a acestei substanțe ar putea fi deficientă la unii indivizi, care ar fi deci în mod special vulnerabili la atacurile virusurilor și cărora ar trebui să li se administreze această substanță.

Extinderea și ameliorarea testelor clinice au depins direct de progresele înregistrate în purificarea interferonului. Preparatele utilizate în 1980 și 1981 aveau o puritate de 80% și activitatea lor specifică depășea 10^7 unități internaționale pe miligram de proteină. Dar puritatea unui preparat putea să însemne, în egală măsură, separarea unui tip de interferon dintr-un amestec complex și singurul mod de a obține unul din cei opt interferoni α (subtipuri) era de a-l sintetiza cu ajutorul unui clon de celule bacteriene, cărora le-a fost transferată, integrată într-o plasmidă, gena corespondentă. Testele realizate cu aceste subtipuri au avut drept scop să verifice dacă ele au activități distincte și complementare, și dacă unele dintre ele nu prezintă efecte secundare. Astfel, după observațiile făcute de Merigan, la Universitatea Stanford, subtipul α_2 (produs de Genentech și Hoffmann — La Roche) provoca efecte secundare la om, în timp ce, după cercetătorii olandezi, administrarea aceluiași subtip (produs de Biogen) unor maimuțe Rhesus nu provoca reacții febrile. Acest interferon leucocitar era, de asemenea, eficace în lupta împotriva virusului vaccinei la această specie de animale.

Purificarea diverselor tipuri și subtipuri de interferon ar trebui să cunoască progrese spectaculoase ca urmare a producerii anticorpilor monoclonali, utilizabili în cromatografia de afinitate pentru reținerea selectivă a interferonilor (v. pag. 93). Au fost produși anticorpi monoclonali contra interferonilor leucocitari (Montagnier, Institutul Pasteur, Paris) și fibroblastic (Erlich, Cetus Corporation; Trapman, Universitatea Erasmus; Hochkeppel, Braunschweig) în 1980 și 1981. O tehnică specială consta în încapsularea celulelor hibridoamelor într-o membrană glucidică poroasă care permite hrănirea celulelor fără să fie expuse mediului exterior. După șapte zile, în loc de 15—21 de zile în cazul metodelor de cultură a celulelor hibridomilor „in vivo", capsulele erau deschise cu ajutorul heparinei și hibridmii erau separați de anticorpii monoclonali care trebuiau să servească la purificarea interferonului obținut prin recombinare genetică. Această tehnică a microîncapsulării a fost pusă la punct de societatea de biotehnologie americană Damon, care a semnat, în 1982, un contract cu Hoffmann—La Roche pentru a o aplica la purificarea interferonului leucocitar.

În concluzie, testele clinice efectuate între 1980 și 1982, care, în definitiv, puneau probleme de mai multe feluri (v. pag. 261) nu au permis ca interferonului să i se confere calificativul de „medicament miracol". S-a considerat, totuși, că este vorba despre o substanță care trebuie să ia loc în arsenalul terapeutic de luptă împotriva maladiilor virale și eventual împotriva cancerului.

Producerea de substanțe imunogene și de vaccinuri

Producerea unor vaccinuri eficace, sigure și puțin costisitoare, reprezintă un alt domeniu de aplicare a recombinărilor genetice.

În mai 1980, o echipă franceză (Institutul Pasteur, INSERM, CNRS) a obținut sinteza unei proteine-vaccin a virusului hepatitei B cu ajutorul

bacteriilor şi apoi cu ajutorul celulelor de şoarece cu genomuri modificate. Este adevărat că acest antigen poate fi purificat pornind de la plasma purtătorilor care nu prezintă simptomele bolii; dar sinteza antigenilor virali, care determină răspunsul imunitar, cu ajutorul unui microorganism căruia îi este transferată gena responsabilă, prezintă avantajul că nu recurge la microbi ucişi sau cu virulenţa redusă, sau, şi mai mult, la eliminarea substanţelor toxice ori infecţioase care însoţesc adesea antigenul extras din culturile de celule. Aceste produse lipsite de toxicitate vor avea în plus meritul de a reduce considerabil testele de toxicitate care sînt foarte lungi şi costisitoare.

Hepatita B constituie o problemă gravă de sănătate publică, în măsura în care această boală, care, în 1980 afecta 200 de milioane de persoane, se transmite de la mamă la copil în timpul perioadei perinatale şi rămîne ascunsă în urma contactelor apropiate între purtători, fiind însoţită de tulburări grave ale ficatului sau chiar de cancer hepatic.

Plasma bolnavilor conţine particule de mărimi şi forme diferite şi în proporţii variabile: particule sferice sau filamentoase, cu un diametru de ordinul a 22 nm, care nu conţin ADN şi reprezintă învelişul extern viral; particulele lui Dane, mai rare, avînd un diametru de 42 nm, care reprezintă virionul şi constau dintr-un înveliş extern şi o nucleocapsidă de 27 nm ce conţine o moleculă de ADN. Nucleocapsidele libere servesc la prepararea vaccinului şi studiul lor imunochimic a fost aprofundat, în special în ce priveşte antigenul de suprafaţă HBsAg.

Învelişul extern viral conţine lipide şi proteine caracteristice, dintre care unele sînt glicozilate. Două polipeptide, PI şi PII, sînt prezente în cantităţi egale; structura lor primară este probabil identică, dar PII este glicozilat; greutatea moleculară a lui PII a fost estimată la aproximativ 29 000 de daltoni (Tiollais ş.a., 1981). Se presupune că regiunea acestor polipeptide cuprinsă între reziduurile 114 şi 143 ar fi răspunzătoare de eterogenitatea determinanţilor antigenici ai antigenului de suprafaţă al virusului (HBsAg). Învelişul extern viral este constituit dintr-un strat dublu lipidic în care se află instalaţi dimeri constituiţi de cele două polipeptide PI şi PII, unite prin punţi-disulfidice (între lanţurile şi în interiorul lanţurilor polipeptidice), astfel încît să posede structura terţiară şi cuaternară cît şi proprietăţile antigenice şi imunogenice ale HBsAg (Tiollais ş.a., 1981).

Nucleocapsida, care conţine antigenul HBcAg, este constituită în mod esenţial dintr-un polipeptid de 29 000 de daltoni. Antigenul HBcAg este decelat în urma tratamentului cu un detergent non-ionic (NP40) al virionului extras din sîngele bolnavilor cronici. Un alt antigen care se face remarcat în plasmă este antigenul „e" (HBeAg).

ADN-ul viral este compus din aproximativ 3 200 de nucleotide. Summers ş.a. consideră că el este constituit din două spirale filiforme, helixul *L* cu o lungime determinată şi helixul *S*, scurt, dar de lungime variabilă; o asemenea structură a fost confirmată de studiile mai multor cercetători (Tiollais ş.a., 1981). Determinarea secvenţei nucleotidice complete a ADN-ului viral clonat a adus dovada că antigenii HBsAg şi HBcAg sînt sintetizaţi sub controlul ADN-ului particulelor lui Dane şi că cele două gene se află pe aceeaşi moleculă de ADN.

Transmiterea pe cale naturală sau experimentală a virusului hepatitei B s-a realizat numai la cimpanzei şi oameni. Nu a fost posibilă cultivarea virusului pe ţesuturi, şi nici experienţele pe animale de laborator n-au fost

încununate de succes. O specificitate atît de strictă a virusului şi lipsa unui sistem de înmulţire *in vitro* a acestuia au făcut şi mai dificile cercetările asupra biologiei agentului infecţios. Studiul expresiei genelor virusului este totuşi înlesnit prin introducerea în liniile celulare, a genomului viral (clonat anterior) sau a unor fragmente ale acestuia din urmă. Astfel, Dubois ş.a. (1980, Tiollais ş.a., 1981) au reuşit să introducă ADN-ul viral în celule *L* de şoarece; ei au constatat că acest ADN s-a integrat ADN-ului celular şi că se produceau particule HBsAg în mediu fără să existe o lizare a celulelor; ceilalţi antigeni n-au fost decelaţi. Moriarty ş.a. (1981, Tiollais ş.a., 1981) au elaborat o moleculă hibridă de ADN constituită din ADN-ul virusului SV40 şi dintr-un fragment de ADN al unui virus al hepatitei B, apoi au introdus-o în celule renale de maimuţă şi au observat sinteza particulelor HBsAg. Hirschman ş.a. (1980, Tiollais, 1981) au reuşit infectarea unor celule HeLa cu ADN viral clonat şi au observat că cei doi antigeni HBsAg şi HBcAg sînt sintetizaţi de celulele HeLa, care produc, probabil, ansamblul virionului.

Integrarea unei părţi sau a întregului unui ADN viral în genomul celulelor hepatice a fost demonstrată de mai mulţi cercetători; dacă s-ar confirma caracterul său general, atunci rolul virusului în etiologia cancerului la ficat ar fi mai bine stabilit.

Clonarea ADN-ului viral în celulele de *Escherichia coli* şi introducerea lui în liniile celulare de mamifere au făcut să fie învinse dificultăţile datorate imposibilităţii de a obţine înmulţirea virusului *in vitro*. Totuşi prezenţa virusului la marmote şi veverite, cît şi la raţe, ar putea deschide noi perspective cercetărilor asupra înmulţirii virusului şi asupra interacţiunilor între gazdă şi agentul infecţios. Pe de altă parte, sinteza HBsAg pornind de la ADN-ul viral clonat în celulele procariote şi eucariote ar putea furniza alte tipuri de antigeni, care ar fi mai siguri şi mai economici pentru fabricarea vaccinurilor. Astfel, Edman ş.a. (1981) au reuşit să cloneze ADN-ul virusului hepatitei B şi au produs cantităţi însemnate de antigen de suprafaţă. Expresia antigenului de suprafaţă glicozilat a fost obţinută în celule de drojdie de către Rutter, de la Universitatea din California, la San Francisco. Era vorba de o realizare foarte importantă în vederea producerii, *in vitro* şi la scară industrială, a unui imunogen.

De asemenea, pentru producerea unui vaccin împotriva turbării, cercetătorii societăţii franceze Transgène s-au străduit, în 1981 şi 1982, să sintetizeze, cu ajutorul celulelor de *Escherichia coli*, o proteină de suprafaţă a virusului rabic. În iulie 1982, aceşti cercetători, în colaborare cu Wistar Institute of Anatomy and Biology, din Philadelphia, au reuşit să izoleze un clon de colibacili care produc o proteină a virusului cu o greutate moleculară de 58 000 şi al cărui ADN a fost introdus în celulele bacteriene. Acest ADN a fost elaborat de cercetătorii de la Wistar Institute pornind de la ARN-ul mesager care determină sinteza acestei proteine în celulele infectate de virsului turbării.

Cercetătorii s-au străduit să obţină sinteza acestei proteine virale în culturile de celule de mamifere, pentru a o îmbunătăţi şi pentru a verifica dacă ea posedă toate proprietăţile imunogenice pentru a intra singură în compoziţia unui nou tip de vaccin antirabic.

Turbarea este o zoonoză care continuă să facă ravagii în mod endemic la animal şi la om în numeroase ţări din Africa, America de Sud şi Asia. Incidenţa cazurilor de turbare la animalele sălbatice şi domestice a crescut

chiar în unele țări europene. Vaccinarea preventivă se lovește de prețul ridicat al vaccinurilor fabricate în prezent, din cauza complexității tehnicilor de cultură a virusului în celule umane, a procedeelor de extracție, de inactivare a particulelor virale și de purificare a vaccinului. Fabricarea unui vaccin mai puțin costisitor pornind de la o proteină virală cu proprietăți necesare ar reprezenta un progres considerabil, atît pe plan industrial cît și pe planul sănătății publice. Ca urmare a rezultatelor obținute de Transgène, semnarea unui contract de cercetare între această societate și Institutul Mérieux, avînd ca scop producerea unei glucoproteine a virusului rabic prin inginerie genetică și studierea proprietăților sale imunogene, dovedea importanța practică a acestor rezultate.

Cultura pe medii artificiale a agentului sifilisului, *Treponema pallidum*, este imposibilă, ca și fabricarea de vaccinuri prin tehnicile obișnuite prin extragerea și purificarea antigenilor. ADN-ul acestui spirochet, prelevat din testicule de iepure infectate, a fost extras și clonat în celulele de *Escherichia coli*, utilizînd ca vector un colifag. Lovett și colaboratorii săi (University of California School of Medicine), care au reușit această clonare în 1982, au constatat că una din sușele bacteriene cu genom modificat posedă cel puțin șapte antigeni caracteristici ai treponemei. Aceste cercetări ar fi menite să creeze posibilitatea punerii la punct a testelor de diagnostic al sifilisului mai specifice decît cele efectuate în general și să conducă la realizarea unui vaccin eficace (acesta din urmă este cu atît mai necesar cu cît sușele de treponemă au tendința de a dobîndi o rezistență la antibioticele întrebuințate curent în tratamentul sifilisului). Alte două echipe americane s-au interesat de acest domeniu: echipa lui Norgard (University of Texas Health Science Center, Dallas), care a obținut în acest scop o subvenție de 240 000 de dolari pe trei ani de la National Institutes of Health, și echipa lui Stamm (University of North California School of Medicine, Chapel Hill).

În domeniul veterinar, producerea de vaccinuri prin tehnicile de recombinare genetică ar face posibilă stîrpirea unor boli de temut ca febra aftoasă sau rujetul porcilor.

Febra aftoasă este o boală foarte contagioasă care afectează în jur de 30 de specii de animale și care se manifestă în mod special la bovine, ovine și porcine. Chiar dacă mortalitatea nu este ridicată, animalele bolnave sînt foarte slăbite și productivitatea lor este aproape nulă. Pentru ca această boală virotică să nu se extindă, animalele bolnave sînt în mod sistematic tăiate și se iau măsuri de carantină privind carnea și laptele produse într-o țară în care se manifestă această boală. Pierderile suferite sînt considerabile.

Deși s-a efectuat o vaccinare într-un mod mai mult sau mai puțin sistematic încă din 1940, în zonele unde febra aftoasă are un caracter endemic, și în ciuda celor peste un miliard de doze de vaccin folosite anual, această boală este încă foarte răspîndită. Vaccinurile au fost fabricate pornind de la preparate de virus inactivat, cultivat anterior, în celulele renale de hamsteri nou-născuți sau pe fragmente de epiteliu de limbă de bou. Aceste vaccinuri au fost în ansamblu eficace, dar ele prezentau anumite inconveniente: de exemplu, mai multe sușe virale nu puteau fi cultivate în concentrație suficientă pentru a furniza destulă substanță antigenică de vaccinat; particulele virale sînt foarte instabile, în special la un $pH < 7$, astfel încît vaccinurile trebuie să fie păstrate într-o incintă refrigerată pentru ca eficiența lor să rămînă intactă (această conservare la frig nu este întotdeauna ușor de realizat în

țările tropicale în care febra aftoasă face ravagii); izbucniri recente ale acestei boli în Europa (în Jersey și insula Wight) au fost puse pe seama folosirii de vaccinuri în care inactivarea virusului nu a fost suficientă (Bittle ș.a., 1982); mulțimea serotipurilor (șapte) și a subtipurilor (peste 60) necesita prepararea de vaccinuri polivalente sau de vaccinuri adaptate unor regiuni determinate, care permiteau să fie modificate destul de rapid în funcție de apariția altor sușe virulente. Diversele inconveniente i-au făcut pe oamenii de știință să studieze structura virusului și constituenții care determină activitatea sa imunogenică pentru a elabora vaccinuri mai sigure și mai eficace. Această elaborare se impunea cu atît mai mult cu cît nevoile erau considerabile din cauza campaniilor de vaccinare sistematică a animalelor de prăsilă. Astfel, în țările Europei Occidentale, au fost vaccinate între 1955 și 1980, peste 60 de milioane de capete de vite, ceea ce a făcut ca boala aproape să dispară. În America de Sud, unde febra aftoasă este endemică, s-au produs în fiecare an 500 de milioane de doze dintr-un vaccin polivalent.

Virusul febrei aftoase aparține genului *Aphtovirus* din familia *Picornaviridae*. El conține o moleculă de ARN monocatenar cu o greutate moleculară de ordinul $2{,}6 \cdot 10^6$, înconjurată de o capsidă constituită din patru polipeptide, VP_1, VP_2, VP_3 și VP_4, din care există 60 de cópii din fiecare. Acțiunea tripsinei asupra virusului are ca efect clivarea polipeptidei VP_1, reducerea serioasă a puterii infecțioase și determină, în funcție de sușele virale, pierderea puterii de imunizare (Wild, Burroughs și Brown, 1969; Bittle ș.a., 1982). Acest polipeptid, VP_1, posedă singur o putere de vaccinare foarte mică, în timp ce celelalte trei nu au deloc. Laport (1973) în Franța și Bachrach ș.a. (1975) în S.U.A., au demonstrat (pe cobai și porc) că folosirea unor doze puternice de VP_1 (Brooksby, 1981) apără aceste animale împotriva unui atac viral.

Avantajele unui vaccin constituit de proteina virală de vaccinare, preparată astfel încît să se evite mînuirea oricărui material infecțios după izolarea ARN-ului viral și care să se preteze producerii de cantități superioare celor obținute prin procedeele obișnuite, sînt evidente. În acest scop au putut fi folosite tehnicile de recombinare genetică: în S.U.A. (Departamentul Agriculturii și Genentech), în R.F.G. (Secția de Microbiologie a Universității din Heidelberg, Institutul Federal de Cercetare asupra Virozelor Animale — Tübingen și Insitutul Max Planck de Biochimie din München) și în Marea Britanie (Animal Virus Research Institute și Wellcome Foundation).

Oamenii de știință germani (Küper ș.a. 1981) au reușit să cloneze ADN-ul copie dicatenar care corespunde ARN-ului viral, integrat într-o plasmidă de *Escherichia coli* (pBR322). Secvența nucleotidică corespondentă proteinei VP_1 a fost identificată și inserată la rîndul ei într-o plasmidă, în scopul de a obține sinteza acestei proteine în colibacili. Testele serologice au permis evaluarea numărului de molecule de VP_1 sintetizate într-o celulă bacteriană la cel puțin 1 000. Sporirea acestui randament era de maximă importanță, în măsura în care s-a constatat că pentru a imuniza animale doar cu proteina VP_1 trebuia să se utilizeze de o mie de ori mai mult antigen decît folosind virionul activ. În afară de acest aspect cantitativ, era probabil avantajos să se sintetizeze precursorul polipeptidic al VP_1 și să fie folosit ca proteină de vaccinare.

Kleid ș.a. (1981, în Bittle ș.a., 1982) au reușit să obțină $1-2 \times 10^6$ cópii de VP_1 pe celulă de *Escherichia coli*.

Proteina obținută prin recombinare genetică nu părea mai activă (la cantități egale) decît proteina VP_1 extrasă din particule virale, și rămîneau să fie mai bine cunoscute particularitățile structurale, indispensabile unei imunizări eficace, înainte de a se considera că VP_1 poate fi substituită virionilor inactivați pentru prepararea vaccinurilor împotriva febrei aftoase. În această perspectivă, un progres important l-a constituit determinarea secvențelor aminoacizilor lui VP_1 pornind de la secvențele nucleotidice ale genomului viral. În 1981 și 1982, au fost stabilite aceste secvențe pentru proteinele VP_1 a două sușe virale aparținînd serotipului A și pentru cea a unei sușe din serotipul O (Bittle ș.a., 1982). În acest din urmă caz, siturile imunogene se aflau la jumătatea C-terminală a proteinei.

Bachrach și colaboratorii săi din Departamentul American al Agriculturii (Animal Disease Center, din Plum Island, Statul New York) au făcut cunoscută, în 1981, punerea la punct a unui vaccin constituit de proteina VP_3, sintetizată, de asemenea, de bacterii cu genom modificat. Testele de vaccinare efectuate la taurine și porcine au fost concludente, dar protecția n-a fost eficace decît împotriva unei sușe speciale a virusului. Cercetările Departamentului American al Agriculturii în acest domeniu au început în 1953, dar ceea ce a permis, datorită unei strînse colaborări cu societatea Genentech, realizarea unui progres atît de însemnat, a fost folosirea tehnicilor de recombinare genetică.

Genentech se angaja, într-adevăr, să aducă pe piață în 1984 un astfel de vaccin, mai puțin costisitor, care nu prezintă nici un pericol și care nu era necesar să fie păstrat într-o incintă refrigerată.

Societatea olandeză de produse veterinare Intervet International (filiala din grupul Akzo) a comercializat, în Olanda la sfîrșitul lunii martie 1982 și în Marea Britanie începînd din luna mai 1982, două vaccinuri fabricate prin tehnicile de recombinare genetică și destinate să prevină diareile de natură infecțioasă cauzate la viței și la porci de colibacilii patogeni. Antigenii bacterieni K-88 și K-99 au fost responsabili de această boală la porci și la viței; ei au fost în general purificați pornind de la sușele sălbatice de bacterii. Oamenii de știință de la Intervet au reușit să transfere și să cloneze genele responsabile de sinteza acestor doi antigeni în sușa K-12 de *Escherichia coli* pentru a recupera cantitățile indispensabile preparării vaccinului. Asocierea acestor antigeni unui adjuvant făcea posibilă prepararea unui vaccin care determină la vaci sau la scroafe producerea de anticorpi protectori ai animalelor tinere, care le erau introduși prin intermediul colostrului și laptelui. Aceste lucrări au fost întreprinse în 1979 în colaborare cu Institutul Olandez al Sănătății la Bilthoven și firma Organon, altă filială a grupului Akzo.

În S.U.A., societatea Cetus, în asociație cu Norden Laboratories (filială a societății Smith Kline Corporation, din Philadelphia) și Tech America Group, a pus la punct vaccinuri analoage pe care spera să le comercializeze în 1983 sau 1984 după acordul Departamentului American al Agriculturii. Societatea Molecular Genetics a reușit să producă, în 1982, anticorpi monoclonali împotriva unuia dintre antigenii bacterieni toxici (K-99); acești anticorpi, administrați unor viței tineri, i-au protejat împotriva infecției.

Danforth și colaboratorii săi (Departamentul American al Agriculturii) au obținut în 1982 descendenți de hibridomi care produc anticorpi monoclonali împotriva unei specii deosebit de virulente de coccidie, *Eimeria tenella*, răspunzătoare de enteritele acute ale puilor de găină și care cauzează crescă-

torilor pierderi evaluate la 300 de milioane de dolari pe an. Cercetătorii americani proiectau izolarea, cu ajutorul anticorpilor monoclonali, a antigenilor coccidiei pentru a produce un vaccin.

Dintr-o abordare analoagă celei a cercetărilor asupra virusului febrei aftoase s-au inspirat lucrările făcute de Kitamura ş.a. (1981) asupra virusului poliomielitei. Acest grup de oameni de ştiinţă de la Institutul de Cercetări asupra Cancerului din Tokio, de la California Institute of Technology, de la Şcoala de Medicină a Universităţii din statul New York, din Stony Brook, şi de la Institutul Pasteur a reuşit să determine structura primară a moleculei de ARN a poliovirusului. Landsteiner şi Popper, în 1908, arătaseră că virusul acesta este agentul cauzal al poliomielitei, iar vaccinurile fabricate începînd cu a doua jumătate a anilor '50, pornind de la virusuri moarte sau cu virulenţă atenuată, au contribuit pe larg la regresul acestei boli în ţările industrializate. Ea rămîne totuşi o afecţiune de temut, în special în ţările în curs de dezvoltare şi, în ciuda cercetărilor intensive, mecanismele precise ale replicării poliovirusului în celula gazdă, ale efectelor lor citopatologice, precum şi natura moleculară a atenuării virulenţei continuau să fie puţin cunoscute.

Kitamura ş.a. (1981) au determinat structura ARN-ului viral, care este constituit din 7 433 de nucleotide, poliadenilate la extremitatea 3' şi care este legat de o mică proteină (VP_g) la extremitatea 5'. Aceasta era prima descriere completă a structurii primare a genomului unui ribovirus. Aceiaşi cercetători au determinat de asemenea regiunile responsabile de sinteza diferitelor proteine virale, ale căror secvenţe de aminoacizi au fost stabilite. Structura chimică a virionului (greutatea moleculară: $8{,}25 \cdot 10^6$) era astfel elucidată. Expresia informaţiei genetice a acestui poliovirus (tip I, suşa Mahoney) are un caracter particular, deoarece ansamblul acestei informaţii este tradus sub forma unei poliproteine, care este apoi clivată în mai multe polipeptide avînd funcţii distincte.

Cunoaşterea exactă a structurii genomului şi a organizării genelor poliovirusului este indispensabilă punerii la punct a unor noi vaccinuri antipoliomielitice. Aceasta constă din izolarea unor suşe cu virulenţă atenuată, incapabile să redevină virulente, sau din sintetizarea antigenilor virali cu ajutorul unor bacterii cu genom modificat prin recombinare genetică. O a treia orientare de cercetare este cea care constă în elaborarea unor inhibitori specifici proteinazelor virale, cunoscînd caracteristicile modului lor de clivaj, şi în îmbogăţirea, în acest fel, a arsenalului substanţelor terapeutice antivirale.

Trebuie remarcată, de asemenea, tehnica producerii vaccinului inactivat împotriva poliomielitei, obţinut prin cultura virusului pe celule de maimuţă conţinînd un număr anormal de cromozomi (celule heteropolide sau celule vero). Folosirea acestor celule pentru producerea de vaccin nu a fost autorizată pînă în 1982 decît în scopuri ţinînd de medicina veterinară, din cauza riscurilor de cancer pe care ele puteau să le prezinte. Dar numeroase teste au demonstrat că această teamă nu era justificată şi Institutul Mérieux, din Franţa, a primit autorizaţia să producă vaccinul antipoliomielitic inactivat prin această tehnică. Avantajul acesteia era în mod esenţial de ordin economic. Într-adevăr, celulele heteroploide puteau fi cultivate în suspensie pe microsuporturi plasate în fermentatoare cu un volum care ajunge pînă la 500 l, în timp ce celulele diploide erau cultivate în flacoane de capacitate mică, ceea ce necesită manipulări numeroase şi un personal aparte. Ar trebui,

aşadar, ca preţul de cost al vaccinului să scadă considerabil, mai ales în interesul ţărilor în curs de dezvoltare. Vaccinul împotriva turbării urma să fie produs prin aceeaşi tehnică la Institutul Pasteur din Paris.

Utilizarea tehnicilor de recombinare genetică pentru producerea vaccinurilor este un pas în direcţia fabricării vaccinurilor sintetice. Aceasta reprezintă, pe termen lung, o dezvoltare însemnată, în măsura în care aceste vaccinuri vor putea înlocui pe cele produse pornind de la bacterii şi virusuri, care pot conţine grupări de antigen străine, proteine şi alte substanţe care pot contamina substanţa imunogenă esenţială şi pot produce efecte secundare nedorite (Zuckerman, 1982).

Primul exemplu de imunizare activă împotriva unei toxine bacteriene, toxina difterică, cu ajutorul unui antigen sintetic a făcut obiectul unei lucrări publicate de Audibert ş.a. (1981). Toxina difterică este un lanţ polipeptidic unic cu o greutate moleculară egală cu 62 000 şi conţinînd două punţi disulfidice. Bucla de 14 aminoacizi, susţinută de puntea disulfidică lîngă extremitatea N-terminală, a fost implicată în toxicitatea şi specificitatea imunogenă a moleculei. Un tetradecapeptid sintetic legat, prin covalenţă, de doi purtători diferiţi determina la cobai producerea de anticorpi care se uneau în mod specific cu toxina şi neutralizau efectele ei dermonecrotice şi letale.

Inducerea unei imunităţi specifice a fost, de asemenea, cauzată de un peptid sintetic format din numai 12 aminoacizi care face parte din proteina M de *Streptococcus pyogenes*. Imunogenicitatea acestor oligopeptide face posibilă proiectarea unor vaccinuri sigure împotriva infecţiilor streptococice, responsabile mai ales de reumatismul articular acut şi de pericolele cardiace corespunzătoare.

În ceea ce priveşte vaccinurile sintetice împotriva hepatitei B, peptidele imunogene au fost sintetizate de mai multe grupuri de oameni de ştiinţă, de exemplu Dressman ş.a. (1982). Aceştia din urmă au fabricat două peptide ciclice, conţinînd punţi disulfidice în regiunea cuprinsă între aminoacizii 117 şi 137 ai polipeptidului care corespunde antigenului viral de suprafaţă (în total 226 aminoacizi). Aceste două peptide, cuprinzînd aminoacizii 117—137 şi 122—137 au fost incorporate mai multor adjuvante, înainte de a fi injectate unor şoareci pe cale intraperitoneală. Urma să se constate dacă anticorpul antihepatită B (antigen de suprafaţă) este produs la 7—14 zile după inoculare la jumătate din numărul şoarecilor din fiecare grupă. Acest răspuns venea în urma unei singure injectări cu peptidul neasociat unei proteine purtătoare. Concentrarea anticorpilor se micşora la majoritatea animalelor în cea de a 21-a zi. O problemă esenţială pentru oamenii de ştiinţă a fost să se încredinţeze dacă aceste peptide sintetice ofereau o protecţie reală şi longevitate imunităţii astfel conferite, mai întîi la cimpanzei, apoi la om.

Bittle şi colaboratorii săi de la Research Institute of Scripps Clinic, din La Jolla, în California, şi de la Animal Virus Research Institute, din Pirbright (Surrey), în Marea Britanie, au sintetizat peptide corespunzînd mai multor zone ale proteinei VP_1 ale virusului febrei aftoase şi au constatat că una dintre peptide, conţinînd aminoacizii 141—160, asociată cu hemocianina de scoică comestibilă (KLH) şi administrată cu un adjuvant, determină formarea de anticorpi împotriva virusului febrei aftoase la cobai şi iepuri. Aceştia din urmă erau pe deasupra protejaţi şi împotriva unui atac viral ulterior (Bittle ş.a., 1982). Rezultatele preliminare au permis acestor oameni de ştiinţă să afirme că, la greutate egală, această peptidă are 1—10% din

activitatea imunogenă a virionului inactivat, și că stimularea producerii de anticorpi la animal este de mai multe ori superioară celei realizate în cele mai bune cazuri de inducere obținută cu proteina VP_1 neasociată (fie că aceasta era extrasă din virion ori produsă prin recombinare genetică). Un alt avantaj al folosirii acestei peptide îl constituia faptul că producerea de anticorpi avea loc în urma unei singure inoculări (o vaccinare eficace pe teren, cu o singură injecție este într-adevăr mult căutată). Administrarea acestei peptide 141—160 unor porcine și bovine a demonstrat, de asemenea, că ea poate declanșa o producere de anticorpi suficientă pentru a proteja aceste animale (Bittle ș.a., 1982). O altă peptidă, conținînd aminoacizii 200—213 de VP_1, determina, de asemenea, formarea anticorpilor împotriva virusului febrei aftoase.

Aceste rezultate demonstrau că peptidele sintetice care conțin secvența specială a aminoacizilor corespunzînd antigenului pot să reacționeze cu anticorpii produși împotriva antigenului natural intact. În cazul bacteriofagului MS2, Langbeheim, Arnon și Sela (1976, Beale, 1982) au constatat că o peptidă din 20 de aminoacizi (89—108) aparținînd unei proteine a capsidei este capabilă să determine la animal producerea de anticorpi care neutralizează bacteriofagul și care sînt la fel de eficace ca anticorpii produși împotriva bacteriofagului intact sau împotriva proteinei capsidei.

Aceste rezultate au demonstrat și faptul că peptidele cu proprietăți imunogene speciale pot să fie folosite la prepararea vaccinurilor. În cazul febrei aftoase avantajale unei asemenea preparări ar fi: evitarea problemelor legate de inactivarea necorespunzătoare a virusului și de instabilitatea vaccinurilor obișnuite la un $pH < 7$ și la temperatura mediului ambiant, posibilitatea utilizării ca imunogene a peptidelor sintetice corespunzînd diverselor stereotipuri de virus și, poate, obținerea unei bune imunizări ca urmare a injectării unei doze unice de vaccin.

Dar, după opinia lui Beale (1982), aspectele economice vor fi cele determinante, deoarece, în ciuda inconvenientelor semnalate, vaccinurile împotriva febrei aftoase, preparate prin inactivarea virusului, sînt vaccinuri relativ puțin costisitoare. Va fi așadar necesar ca vaccinul preparat pornind de la peptidele sintetice să fie la un preț de cost competitiv. Situația era deosebită în cazul vaccinurilor fabricate împotriva virusului hepatitei B, care sînt foarte scumpe. Un alt aspect important al producerii vaccinurilor sintetice a fost cel legat de natura purtătorului *(carrier)*. Acesta din urmă era în cazul peptidelor de VP_1, hemocianina (KLH), considerată ca o proteină foarte imunogenă. Utilizarea unor asemenea substanțe riscă în mare măsură să reducă avantajele unui vaccin sintetic și să provoace o hipersensibilitate ca urmare a injecțiilor repetate. Este așadar necesară studierea altor purtători mai ușor de obținut, mai bine tolerați de organismul animal și care nu ascund efectul direct al vaccinului. Natura adjuvantului este un alt domeniu important de cercetare, precum și cel relativ la o mai bună asociere între purtător și adjuvant. Acesta din urmă este, în cazul vaccinurilor utilizate în mod curent împotriva febrei aftoase, hidroxidul de aluminiu, care a fost de asemenea utilizat cu succes în experiențele de vaccinare cu peptide sintetice de către Bittle ș.a. (1982). După opinia lui Beale (1982), acest domeniu al adjuvanților rămîne, totuși, de explorat în continuare.

Rezultatele tuturor acestor cercetări demonstrează că, trecînd peste toate incertitudinile și problemele care mai sînt de rezolvat, oamenii de știință se apropie de faza producerii vaccinurilor sintetice polivalente împotriva mai multor agenți patogeni și a inducției de anticorpi avînd o structură determinată.

Posibilități de recombinare genetică la microorganisme

Experiențele de recombinare genetică au fost făcute pe colibacil (*Escherichia coli*), care a fost ales, în anii '50, ca model pentru cercetările de biologie moleculară. În treizeci de ani datele biochimice și genetice acumulate au făcut din această bacterie materialul ales pentru întreprinderea experiențelor de recombinare genetică.

Deoarece colibacilul este un microorganism care se află în mod natural în tubul digestiv al omului, s-au emis, chiar de la începutul experiențelor de inginerie genetică, temeri legate de o eventuală contaminare prin sușele cu genom modificat. Oamenii de știință au hotărît atunci să folosească sușe de *Escherichia coli* incapabile să supraviețuiască în intestinul omului, sau să se servească de plasmide, care nu puteau fi transmise altor sușe bacteriene, pentru a reduce la zero riscurile de contaminare. Aceste temeri s-au dovedit a fi exagerate și atît National Institutes of Health, în S.U.A., cît și Grupul consultativ asupra manipulărilor genetice (Genetic Manipulation Advisory Group), în Marea Britanie, au fixat la 10 1 volumul de cultură de bacterii cu genom modificat, un astfel de procedeu nefiind supus unei aprobări speciale (v. pag. 263).

Dar cercetătorii doreau să întreprindă experiențele lor de recombinare gentică asupra altor microorganisme care nu prezintă vreo relație particulară cu organismul uman, în scopul evitării oricărui inconvenient. Colibacilul conține în peretele celular o endotoxină care este un lipopoliozid, greu de separat de substanțele produse prin recombinare genetică. Extracția și purificarea acesteia erau simplificate dacă ar fi fost excretate de bacterie. Or colibacilul excretează puține proteine în comparație cu alte specii de microorganisme.

Interesul s-a îndreptat atunci către *Bacillus subtilis* și către drojdia *Saccharomyces cerevisiae*. Nevoile nutritive ale lui *Bacillus subtilis* sînt binecunoscute în condițiile de fermentație pe scară largă, deoarece această bacterie este utilizată în producerea de antibiotice, insecticide și enzime ca α-amilaza. *Bacillus subtilis* nu produce endotoxină și, deși există pe piele, nu este nici patogen, nici infecțios, atît la animale cît și la vegetale. Bacilii sînt capabili să excreteze metaboliți secundari și proteine, care sînt apoi ușor de recuperat din mediul de cultură. Peste 40 de enzime extracelulare sînt astfel produse de 20 de specii de bacili (v. pag. 156).

Chiar dacă cunoștințele de genetică moleculară erau mai puțin avansate în cazul lui *Bacillus subtilis* față de *Escherichia coli*, au fost elaborate plasmide capabile să se replice în cele două specii de bacterii. Astfel, oamenii de știință de la societatea Biogen, din Geneva, și de la Centre for Applied Microbiology and Research, din Porton Down, au utilizat o plasmidă mixtă pentru a introduce gena unui interferon leucocitar uman precum și alte gene în *Bacillus subtilis*. Partea plasmidei care aparține bacilului provenea de fapt din *Bacillus*

stearothermophilus, care se dezvoltă la temperaturi de peste 50°C. Plasmida conține o genă de rezistență la tetraciclină și cuprinde un segment de ADN („replicon") care stimulează replicarea și care este stabil la temperaturi ridicate. Plasmida poate în acest fel să servească la transferarea de gene unor bacterii termofile care nu ar putea să se înmulțească la animale sau plante, îndepărtînd astfel pericolul oricărei contaminări. Au fost făcute teste pentru introducerea mai degrabă a genelor străine direct în cromozomul de *B. subtilis*, decît în plasmide, cu scopul de a izola suşe capabile să hidrolizeze deşeurile celulozice și să contribuie la transformarea lor în alcool (Sherwood și Atkinson, 1981, v. pag 86).

Drojdia de bere, *Saccharomyces cerevisiae*, are o constituție genetică mult mai complexă decît cea a colibacilului sau a lui *B. subtilis*, de vreme ce este vorba despre o celulă eucariotă și nu procariotă. Este specia de drojdie cea mai cunoscută din punct de vedere genetic: au fost localizate mai multe sute de gene pe cromozomi (17 în celulele haploide și 34 în celulele diploide; ADN-ul nuclear este format din 30 de milioane de perechi de nucleotide); a fost realizată o cartografie precisă a genelor în ADN-ul mitocondrial (mitocondriile conțin mai multe molecule de ADN, care sînt constituite fiecare din 75 000 de perechi de nucleotide); vreo sută de plasmide de 2 μm se află într-o celulă de drojdie și a fost determinată secvența a 6 000 de perechi de nucleotide care constituie ADN-ul acestei plasmide. Rolul fiziologic al acestor plasmide nu a fost încă pe deplin elucidat, deși în ele se află localizată informația genetică relativă la funcțiile de replicare și recombinare. Aceste plasmide pot fi recombinate cu gene străine și pot servi astfel ca vectori pentru acestea din urmă, în vederea clonării lor în celulele de drojdie sau de colibacil. Au fost transferate plasmide în celulele de drojdie transformate în protoplastă (adică ai căror pereți celulari au fost lizați).

În martie 1981, cercetătorii din secția de genetică a Universității Seattle din statul Washington și cei de la societatea Genentech au reușit să introducă genele unui interferon leucocitar uman în celule de drojdie, sub forma unui plasmid capabil să se replice atît în celule de *S. cerevisiae* cît și în cele de *Elcoli* (v. pag. 44). Întrucît *Saccharomyces cerevisiae* prezintă ca și celulele de mamifere proprietatea de a sintetiza grupările osidice și de a le lega de proteine și deoarece moleculele de interferoni conțin asemenea grupări, care se pare că sînt indispensabile activității lor biologice, producerea acestor substanțe cu ajutorul drojdiilor ar prezenta avantajul unei biosinteze complete. Hitzeman și Leung au reușit pe deasupra să izoleze, în 1982, o suşă de drojdie cu genom modificat care producea în mediul de cultură interferoni α, β și γ sub formă relativ pură. Nu mai era nevoie nici să fie distruse celulele pentru a extrage interferoni, și nici să se efectueze operații suplimentare de purificare pentru a-i separa de celelalte proteine ale drojdiei. Lucrările acestor cercetători, realizate în colaborare cu cei de la societatea Genentech, vizau sporirea cantităților de interferon astfel produse în mediul de cultură, pentru a micşora substanțial prețul lor de cost.

Au fost de asemenea incorporate plasmide într-unul sau în mai mulți cromozomi de drojdie. Se proiecta chiar introducerea în mod succesiv a cîtorva gene străine în celula de drojdie care ar fi apoi în stare să producă mai multe proteine.

Tehnicile de recombinare genetică vor permite modificarea anumitor căi metabolice. De exemplu, prin introducerea genei care dirijează sinteza

glucoamilazei în suşele de drojdie din fabricile de bere, s-ar putea diminua concentraţia de zahăr în must; a fost, de asemenea, posibil să fie schimbat randamentul fermentaţiei alcoolice, modificînd, prin recombinare genetică, echilibrul între enzimele glicolizei. Interesul pe care-l prezintă utilizarea drojdiilor în experienţele de recombinare genetică a fost atestat prin crearea, în S.U.A., a unei societăţi specializate în acest domeniu, Collaborative Research Inc. (Newmark, 1981 d).

Alte experienţe de recombinare genetică au fost efectuate cu microorganisme ca *Pseudomonas* şi *Streptomyces spp.* care joacă un rol important în bioindustrie (v. pag. 170).

Pe de altă parte clonarea şi expresia genelor albuminei din albuşul de ou de găină şi ale unei enzime de şoarece, dihidrofolat-reductaza (DHFR), au fost realizate, în 1982, în celulele de *Methylophilus methylotrophus* de către Hennam şi colaboratorii săi (Corporate Research Laboratory — firma britanică Imperial Chemical Industries, şi Universitatea din Leicester). Această specie de bacterie creşte pe medii care conţin metanolul ca sursă de carbon şi serveşte la producerea biomasei protidice în instalaţiile I.C.I. (v. pag. 175). Genele acestor două proteine au fost inserate în plasmide care au fost introduse apoi în celulele bacteriei; coeficienţii lor de expresie au fost inferiori celor obţinuţi cu *Escherichia coli* pentru gene analoage, dar oamenii de ştiinţă britanici s-au străduit să îmbunătăţească aceste rezultate. Expresia genei dihidrofolat-reductazei a fost realizată de aceeaşi echipă pe *Methylomonas methylovora* şi *Alcaligenes eutrophus*.

Recombinări genetice în celulele şi embrionii de mamifere

Anterior dezvoltării tehnicilor de recombinare genetică, hibridarea somatică, adică fuziunea a două celule somatice, făcea posibil transferul genelor (v. pag. 90). Cînd două linii celulare sînt puse la incubat cu polietilenglicol sau cu virusul inactivat de Sendai, se produce între celule o fuziune care se traduce prin fuziunea nucleilor care conţin cromozomii celor două linii parentale şi care exprimă caracterele lor. Aceste celule hibride pot fi izolate într-un mediu selectiv; anumite caractere sînt apoi legate de anumiţi cromozomi şi se realizează astfel, în mod progresiv, o cartografie a genelor. În cursul diviziunilor, o celulă hibridă poate pierde cromozomii uneia sau a două linii parentale; o genă poate de asemenea să se exprime după ce, timp de mai multe generaţii, a fost reprimată: uneori o genă care nu se exprimă în mod normal într-o linie parentală se poate exprima în celula hibridă. Astfel genele lanţurilor α şi β ale hemoglobinei, care nu s-au exprimat în fibroblaşti, devin funcţionale cînd un fibroblast este contopit cu un eritrocit (un factor de reglare existent în eritrocit pare să activeze genele globinei care se află pe cromozomii fibroblastului).

Inserția și transmiterea genelor de origine virală

Introducerea de gene străine, integrarea lor în genomul unui șoarece și transmiterea lor la urmași au fost realizate pentru prima oară în 1976 de Jaenisch [1] care lucra pe atunci la Salk Institute, în California. Tehnicile de recombinare și de clonare a acizilor nucleici nu erau foarte dezvoltate la acea vreme iar virusurile care puteau servi la introducerea genelor prezentau, pe deasupra, avantajul că se pretau unei analize moleculare amănunțite.

Jaenisch a infectat embrioni de șoarece în stadiul de morulă cu virusul leucemiei murine (M-MuLV), apoi i-a reimplantat în uterul mamelor adoptive. El a observat că unii șoricei (10—40%) deveneau leucemici după cîteva luni. Experiența a demonstrat, de asemenea, că boala, care semăna cu leucemia provocată la șoarecele adult prin inocularea virusului, rezultă în urma integrării genomului viral în toate celulele embrionului, inclusiv în celulele sexuale, și nu numai în cele ale timusului și splinei, cum se putea constata la șoarecele adult infectat experimental.

La o mare parte din șoarecii masculi rezultați din dezvoltarea embrionilor, virusul era într-adevăr integrat în celulele liniei germinale deoarece încrucișarea lor cu femele normale dădea șoareci masculi care transmiteau virusul la 50% din indivizii din generația următoare (numai masculii erau studiați, în așa fel încît să se evite problemele de transmitere „in utero" a virusului). Dacă indivizii masculi ieșiți din embrionii infectați de virus dovedeau o transmitere variabilă și în declin a virusului, toate celulele somatice ale celei de a doua generații de masculi conțineau ADN-ul viral, care era transmis ca o genă normală și dominantă la 50% din descendență (Hogan și Williams, 1981).

Jaenisch a reușit să izoleze o linie de șoareci care deveneau leucemici la vîrsta adultă în absența oricărei infecții și care dobîndiseră un nou caracter genetic ca urmare a integrării stabile a genomului viral în cromozomul cu numărul 6. Analiza acestor linii a demonstrat că integrarea genomului viral avea loc în situsuri cromozomiale diferite în funcție de linie și că tipul de leucemie observat varia de asemenea de la o linie la alta. Genele virale puteau uneori să nu se exprime: expresia lor depindea, într-o oarecare măsură, de locul de inserție a virusului în genomul celular. În momentul în care embrionii erau infectați, nu înainte de implantarea lor, ci în mijlocul gestației, frecvența integrării virusului creștea în toate țesuturile și nu numai în cele ale timusului și splinei (organe „țintă" ale maladiei).

Experiențele făcute de Jaenisch și colaboratorii săi aduceau astfel dovada, pentru prima oară, a integrării stabile a unui material genetic străin în genomul celulelor unei specii de mamifere, al expresiei sale și al transmiterii sale la urmași. Ele permiteau, de asemenea, abordarea studiului uneia dintre problemele esențiale a diferențierii celulare, și anume cauzele funcționării anumitor gene în țesuturi specifice, adică specificitatea celulară a expresiei unei gene.

Virusurile aparținînd aceleiași grupe cu leucemia murină erau, după părerea unor specialiști, vectori eficace pentru transferul genelor (Kelly,

[1] Heinrich—Pette Instituit, Universitatea din Hamburg.

1982). Genomul acestor retrovirusuri este constituit din două molecule de ARN-monocatenar; cînd unul dintre aceste virusuri infectează o celulă, transcriptaza inversă sintetizează o moleculă de ADN complementară celei de ARN-viral și acest ADN se integrează în ADN-ul celulei infectate sub forma unui „provirus" care poate să rămînă stabil ori poate să se detașeze de genomul celular pentru a se replica, să dea naștere unor noi particule virale și să provoace astfel apariția simptomelor maladiei virale.

Integrarea acestor retrovirusuri în genomul celulelor pe care le infectează a fost bine studiată de mai multe grupe de cercetători. Varmus și colaboratorii săi au demonstrat în 1979 că fiecare din cele două extremități ale ARN-ului viral se dubla în ADN pentru a da secvențe nucleotidice speciale numite *long terminal repeats sau LTR* (secvențe terminale lungi repetate); ADN-ul viral sintetizat pornind de la ARN-ul viral și încadrat de aceste LTR era apoi integrat ADN-ului celular în situsuri specifice ale speciei și ale țesutului infectat. Secvențele LTR ale virusului glandei mamare de șoarece (MMTV), lungi de 1 328 de perechi de nucleotide, au fost izolate și clonate în celule bacteriene; sudate la cele două extremități ale unei gene prin tehnicile de recombinare genetică, ele permiteau integrarea acesteia în ADN-ul unei celule-gazdă. Gena timidin-kinază a virusului herpes a fost introdusă în felul acesta în celulele eucariote și s-a constatat expresia genei, adică sinteza enzimei. Secvențele LTR făceau posibilă nu numai integrarea genei, dar și sinteza produsului acestei gene într-o cantitate considerabilă: astfel, în celulele glandei mamare de șoarece de cultură, numărul secvențelor LTR integrate putea să ajungă la 70, în așa fel încît celulele conțineau, după ce erau stimulate de un corticoid, pînă la 1% din greutatea unor proteine produse de gena virală integrată în genomul celular (Crépin, 1982). Analiza secvențelor LTR ale virusului glandei mamare de șoarece a permis următoarele constatări: cîteva perechi de nucleotide care se aflau la extremitate interveneau direct în procesul de integrare, împerechindu-se cu o secvență omoloagă a ADN-ului celular; un lung fragment adiacent determina sinteza unei proteine cu greutatea moleculară de 36 000; promotorul inițierii transcripției cu ajutorul ARN-polimerazei a genei încadrate de LTR conținea secvența de nucleotide caracteristice (TATAA); între promotor și fragmentul ce codifică proteina se află situsul de fixare a receptorului hormonal (corticoid), constituit din aproximativ 50 de perechi de nucleotide. Exista posibilitatea ca acestea să fie folosite în combinări speciale datorită tehnicilor de recombinare genetică, în scopul de a elucida în întregime rolul secvențelor LTR. Secvențele LTR avînd o structură analoagă celei a LTR aparținînd retrovirusurilor au făcut posibilă integrarea unei gene a β-globinei de șoarece care le-a fost asociată (Crépin, 1982). Această integrare se putea realiza în celule de cultură și nu în embrioni, dar în acest caz frecvența integrării genei străine era mult mai slabă: 1/1 000 la 1/1 000 000, față de 1—2% în cazul embrionilor.

Secvențe asemănătoare LTR-urilor au fost evidențiate în ADN-ul nucleului celulelor de șoarece și în cel al celulelor umane; ele ar interveni în expresia virusurilor care infectează celulele, dar și în cea a genelor adiacente, ceea ce ar produce modificări genetice care antrenează unele dereglări celulare (Crépin, 1982).

Introducerea unei gene într-o populație de celule poate așadar să fie realizată ca urmare a infectării acestor celule de către un virus, ca SV40, de exemplu, al cărui ADN va fi recombinat cu cel al genei.

Virionii SV40 sînt particule sferice ale căror capsomere sînt organizate în icosaedru. Ei conțin trei polipeptide și o moleculă de ADN bicatenar circular, care este asociată cu un număr de patru histone, H2a, H2b, H3 și H4. ADN-ul viral este format din 5 243 de perechi de nucleotide (5,24 kilobaze *), a cărui secvență a fost determinată de Weissmann (1978) și de Fiers (1978) și colaboratorii lor. Acest ADN conține informația corespunzătoare sintezei a cinci sau șase proteine virale, dintre care trei se află, probabil, în constituenții capsidei (și una dintre ele este asociată ADN-ului și are o o funcție de reglare). Celelalte două proteine nevirale, codificate de ADN-ul virusului, se află în nucleul celulei gazdă (antigenul T) și în citoplasma acesteia (antigenul t), și ele intervin în replicarea ADN-ului viral și respectiv în transformarea celulei.

Minicromozomul de SV40, o dată ajuns în nucleul unor celule de primate infectate, este transcris în sensul invers acelor de ceasornic pe jumătate din lungimea unei catene (E), pentru a da naștere unor ARN-mesageri responsabili de sinteza antigenilor T și t. Cînd virusul SV40 infectează celule de rozătoare, replicarea inițială a ADN-ului se desfășoară în același fel, dar nu este completă, astfel încît proteinele virale nu sînt sintetizate. Majoritatea celulelor infectate supraviețuiesc și mai puțin de 50% dintre ele se înmulțesc în condiții de cultură care în general inhibă dezvoltarea celulelor normale; aceste celule transformate pot, pe deasupra, să producă apariția tumorilor atunci cînd ele sînt inoculate unor animale sensibile. Aceste celule transformate conțin întotdeauna o parte sau întregul ADN viral integrat ADN-ului celular și produc ARN-mesageri și proteine codificate de genele transcrise inițial.

În 1970, Berg a proiectat elaborarea unor molecule hibride de ADN conținînd ADN-ul virusului SV40 și ADN de origine nevirală. O asemenea operație urma să fie înlesnită de lucrările lui Jackson, Symons și Berg (1972), și de Lobban și Kaiser (1973) asupra transformării extremităților moleculelor de ADN, în vederea unirii lor complementare ulterioare. Cercetările întreprinse de Berg și colaboratorii săi au dus, în 1980, la elaborarea de molecule de ADN-recombinat, conținînd ADN-ul de la SV40 și ADN-ul unor plasmide de colibacil (pSV2, pSV3 și pSV5), în stare să servească drept vectori la introducerea genelor în celulele de mamifere (Berg, 1981). În felul acesta a fost inserată în ADN-ul virusului SV40 gena β-globinei de iepure și ea s-a exprimat apoi în celule de maimuță infectate de acest virus cu genom modificat: în aceste celule s-a putut demonstra sinteza ARN-ului mesager și a β-globinei.

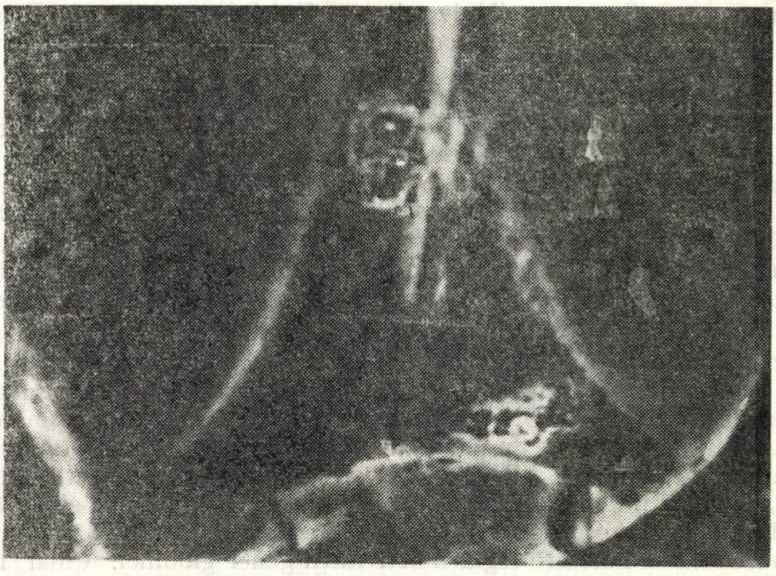
Introducerea unei gene într-o populație de celule poate fi realizată, de asemenea, nu cu ajutorul unui virus, ci prin amestecarea unui fragment de ADN care conține această genă cu un ADN „purtător", apoi prin precipitarea acidului nucleic cu fosfatul de calciu în prezența celulelor. Acidul nucleic

* O kilobază = 1000 perechi de baze nucleotidice.

precipitat poate pătrunde în cîteva celule și gena transferată poate să se exprime în ele și poate fi transmisă la urmașii lor. Această tehnică le-a permis lui Axel, Pellicer, Silverstein și Wigler (Columbia University, College of Physicians and Surgeons) să corijeze o anomalie genetică în celule de șoarece. Ei au folosit un fragment de ADN (purificat pornind de la virusul de herpes) ce poseda gena timidin-kinazei (TK); după amestecul acestui ADN cu cîteva miligrame de ADN din spermă de somon (ADN „purtător"), se realiza un precipitat într-o cultură de celule L de șoarece care nu avea gena (TK^-). O celulă L la un milion incorpora gena TK și aceste celule TK^+ se înmulțeau în mod normal într-un mediu selectiv unde celulele TK^- nu se puteau dezvolta. Anomalia genetică a fost astfel corectată.

Anderson și Diacumakos (1981) au pus la punct, la începutul anilor '70, tehnici de microinjectare a ADN-ului în celule, inspirîndu-se din cele utilizate pentru injectarea de nuclee întregi în ovocite de batracieni denucleate. Ei au întreprins, după aceea, transferarea unei cópii a genei β-globinei într-o celulă L de șoarece (TK^- și care nu sintetizează globina). Această asociație de gene a fost aleasă pentru că gena TK putea fi transferată concomitent cu alte gene.

Enquist (National Cancer Institute) și Summers (Universitatea Yale) au izolat apoi un fragment de ADN al virusului herpes, de 3,5 kilobaze, și



Recombinări genetice în celulele de mamifere.

Injectare de ADN într-un fibroblast de șoarece. Celula este suspendată pe o lamelă la un microscop cu contrast de fază și extremitatea micropipetei care servește la injectarea ADN-ului străin se află la nivelul nucleului celulei. Diametrul exterior al micropipetei este de un micrometru (o miime de milimetru) și diametrul interior de 0,5 micrometri. Soluția salină din micropipetă conține o plasmidă recombinată purtînd gena al cărui transfer este urmărit în genomul celulei de șoarece; volumul de soluție injectată conține o copie a acestei gene. × 6 500.
[Foto: E. G. Diacumakos, The Rockefeller University, New York, In: *Scientific American* (New York), vol. 245, nr. 1, 1981, p. 61.]

care poartă gena TK, clivînd ADN-ul viral cu endonucleaza BamHI. La National Heart, Lung and Blood Institute, Kretschmer a folosit aceeași endonuclează pentru a rupe plasmida pBR322 de *E. coli*, apoi plasmida și ADN-ul viral au fost unite cu o ligază pentru a da o plasmidă recombinată, pX1. Deoarece endonucleaza cliva gena de rezistență la tetraciclină care se afla pe plasmidă, și nu pe cea care conferea rezistența la ampicilină purtată de aceeași plasmidă, bacteriile conținînd plasmida pX1 puteau fi izolate pe un mediu care conținea ampicilină. Pentru a fabrica o plasmidă care conține gena β-globinei, Kaufman, Nienhuis și Kretschmer au acționat în mod analog, folosind mai întîi un fragment de ADN-uman de 15,9 kilobaze conținînd gena β-globinei, care fusese izolat la California Institute of Technology de Maniatis ș.a. După ce din acest fragment a fost detașat, cu ajutorul endonucleazei PstI, un segment mai scurt care conținea gena, ei l-au inserat pe acesta din urmă într-o plasmidă pBR322. Plasmida recombinată, pRK1, conferea rezistența la tetraciclină, dar nu și la ampicilină. Cele două plasmide recombinate au fost clonate separat în celule de colibacil, izolate și purificate.

În laboratorul lui Anderson și Diacumakos, Killos a realizat apoi microinjectarea fiecărui tip de plasmidă în populații de celule L de șoarece (TK^-), cu ajutorul unei micropipete avînd un diametru de 0,5 μm. S-a stabilit, după aceea, prin analize ale ADN-ului acestor celule pe gel (procedeu pus la punct de Southern la Universitatea din Edinburgh), că gena TK fusese introdusă în celule și că ea se replica în mod normal. Același lucru se putea spune și despre gena β-globinei.

Summers și Summers (Universitatea Yale) au reușit să diferențieze timidin-kinaza, sintetizată sub controlul genei TK a virusului herpes, de enzima produsă în celulele normale de șoarece.

Enzima virală poate, într-adevăr, să transforme un precursor în acid citidilic, în timp ce enzima celulelor de șoarece este incapabilă să facă acest lucru. Totuși aceasta din urmă conține o dezaminază care poate efectua conversia și care este inhibată de un compus, THU. Conversia precursorului în acid citidilic, în prezența THU, aduce astfel dovada existenței timidin-kinazei virusului herpetic. Cercetătorii americani, remarcînd prezența acestei gene în două colonii celulare, au reușit prima recombinare genetică într-o celulă de mamifer prin injectarea în nucleul ei a unei gene de origine virală.

În cazul genei β-globinei, rezultatele obținute au demonstrat că două din zece molecule de ARN-mesager al globinei se aflau în celulele L de șoarece, deci un număr destul de apropiat de cel găsit de Axel ș.a. în experiențele lor de transfer utilizînd un ADN „purtător". În plus, Axel și Weissmann (Universitatea din Zürich), care au făcut experiențe analoage, au observat că extremitatea 5' a moleculei de ARN-mesager a globinei lipsea adesea la celulele de șoarece, astfel că nu puteau fi sintetizate molecule complete de globină. Poate că celulele L de șoarece, care nu sînt celule eritroide, nu posedă anumite secvențe nucleotidice necesare reglării activității genei globinei. Chiar în cazul în care gena β-globinei umane era transferată unei celule eritroleucemice (MEL) de șoarece, care sintetiza aproximativ 10 000 de molecule de ARN-mesager al globinei de șoarece, expresia genei umane nu a fost observată.

Gena β-globinei face parte dintr-o regiune întinsă a genomului, care dirijează sinteza mai multor lanțuri diferite de globină. În celulele eritroide, genele globinei sînt induse sau reprimate în cursul dezvoltării organismului, din stadiul embrionar pînă la cel de fetus, apoi de nou-născut. Mai multe

secvențe nucleotidice de reglare influențează, probabil, expresia ansamblului de gene ale globinei (65 de kilobaze). Pentru a obține expresia genei β-globinei, ar trebui să se transfere împreună cu gena respectivă toate părțile genomului care intervin în reglarea activității sale. Clonarea unor fragmente de ADN atît de importante întîmpină dificultăți tehnice. Secvențele nucleotidice de reglare ar putea fi izolate, unite unele cu altele, apoi asociate genei, ansamblul fiind astfel gata pentru transfer.

Unele experiențe de fuziune de celule de șoarece cu celule umane au demonstrat, pe de altă parte, că evoluția anterioară, și anume diferențierea, a celulei din care era extras ADN-ul globinei poate să joace un rol important. Pentru a se putea exprima, gena globinei trebuie să se afle într-un mediu special, care este, în mare măsură, rezultatul diferențierii celulare. Clonarea intermediară a unei gene a globinei în celulele bacteriene ar putea, de asemenea, să producă modificări ale structurii genei, care ar împiedica expresia ei ulterioară în celula de mamifer în care ar putea fi transferată.

Introducerea și expresia genelor în embrioni

Introducerea genelor străine în celulele unui embrion, inclusiv în celulele liniei germinale, face posibil studiul anumitor aspecte ale dezvoltării embrionare, de vreme ce s-ar putea dispune de tinere animale transformate, la care ar putea fi urmărită soarta genei sau genelor transferate. După ce au efectuat experiențe pe ouă de amfibieni, care sînt de dimensiuni mari (adesea de ordinul milimetrilor) și sînt, în general, disponibile în cantitate mare, oamenii de știință au lucrat cu ovocite și embrioni de șoarece, care este mamiferul de laborator cel mai cunoscut pe plan genetic. Primele studii făcute asupra ouălor și embrionilor de șoarece au fost întreprinse către 1960, de către Brinster și Mintz în Philadelphia (Școala Veterinară a Universității din Pennsylvania). De atunci perfecționarea tehnicilor a făcut posibilă stăpînirea, în laborator, a tuturor etapelor de dezvoltare a ovulului fecundat de șoarece, și a deschis calea spre o mai bună cunoaștere a mecanismelor de diferențiere celulară și embrionară.

Dezvoltarea embrionară a șoarecelui începe prin producerea unui număr de zece ovocite care trec în oviducte și sînt fecundate de spermatozoizi douăsprezece ore după emiterea lor de foliculii ovarieni. Un spermatozoid pătrunde într-un ovocit, unde suportă o serie de transformări biochimice; nucleul spermatozoidului crește în volum și devine pronucleul mascul, care poate fi clar observat în vecinătatea membranei ovocitului; el fuzionează, după aceea, cu pronucleul femel și oul care rezultă din această fuziune conține 40 de cromozomi. În cele 24 de ore care urmează, oul se divide fără să se schimbe mult ca volum, în interiorul unui înveliș protector, pentru a da 16—32 de celule: acesta este stadiul de morulă (oul are alura unei mici dude). În morulă se produce apoi o cavitate, blastocelul, plină cu un lichid provenind din fluidele uterine, și blastocistul se implantează în peretele uterului, la patru zile și jumătate după fecundare. Diferențierea embrionară se continuă după vidare.

Există posibilitatea să se provoace ovulația și să se inducă producerea mai multor ovocite. Acestea pot fi prelevate în diferite stadii ale evoluției lor din oviductele femelei de șoarece și cultivate în laborator pînă în stadiul

de blastocist. Fecundarea *in vitro* a ovocitelor pare să fie o operație delicată și, în mod paradoxal, mai greu de realizat decît în cazul ovocitelor umane. Ouăle cultivate *in vitro* pot fi prelevate cu o micropipetă și reintroduse în cavitatea uterină a unei alte femele, unde ele își vor continua dezvoltarea după ce se vor fi implantat în peretele uterin (pentru aceasta, femela trebuie să fie într-o stare fiziologică potrivită, și anume secrețiile ei hormonale să fi pregătit peretele uterin pentru a primi oul; femela este în general împerecheată, cu un mascul steril, ceea ce declanșează secreția hormonilor de către corpii galbeni). 80—90% din ouăle implantate se transformă în șoricei nou-născuți normali.

O dată desfăcută mantaua protectoare de către enzimele proteolitice, oul oferă ocazia unor manipulări, care vor consta, de exemplu, în injectarea unor microcantități de acid nucleic. Oul, al cărui diametru este de ordinul zecimii de milimetru, este reținut la gura unei micropipete și experimentatorul injectează în el, cu ajutorul unei pipete foarte fine de sticlă (diametrul exterior de cîteva zecimi de micron), un volum de ordinul a cîțiva picolitri (10^{-12} litri). Operația se realizează numai la microscop. Injectarea este etapa cea mai critică a manipulărilor, deoarece ouăle sau embrionii par să sufere pierderi ireversibile. Numai cele care supraviețuiesc sînt reimplantate și cercetătorul poate urmări rezultatele experiențelor sale asupra embrionilor prelevați în cursul gestației sau asupra șoriceilor nou-născuți.

Experiențele de microinjectare de gene străine au fost realizate pe ouă abia fecundate, adică aflate înaintea oricărei diferențieri celulare, astfel încît să poată fi urmărită funcționarea acestor gene în celule, apoi în organismul ieșit din ou. Injectarea în nucleu dădea cele mai bune rezultate de integrare și expresie a genelor, injectarea pronucleului mascul oferea, în plus, avantajul că nu rănea prea mult ovocitul, deoarece acest pronucleu se afla în apropierea membranei ovocitului.

În august 1980, Ruddle și colaboratorii săi, la Universitatea din Yale, au fost primii care au obținut inserția genei timidin-kinazei de la virusul herpes în genomul celulelor de șoarece. Alegerea acestei gene fusese impusă de faptul că timidin-kinaza virusului era ușor de deosebit de cea a șoarecelui. 30 000 de cópii ale acestei gene au fost introduse în pronucleul mascul înainte de fuziunea sa cu pronucleul femel. ADN-ul străin s-a integrat ADN-ului cromozomial într-un mod stabil și putea fi găsit în toate celulele oului. La urmă, doi șoricei nou-născuți din șapte conțineau ADN-ul străin în nucleul celulelor lor.

În 1981, Wagner și Stewart, în laboratorul din Mintz, în Philadelphia, au injectat, de asemenea, gena timidin-kinazei de la virusul herpes, dar, de data aceasta, asociată cu cea a β-globinei hemoglobinei umane. Expresia acestei gene, care, în mod normal, nu a avut loc decît în celulele precursoare ale hematiilor, trebuia să fie reperată în măsura în care β-globina sintetizată ar contribui la structura hemoglobinei de șoarece. Rezultatele obținute după injectarea celor două gene în pronucleul mascul erau mai bune decît cele obținute de Ruddle, deoarece, din 33 de șoricei nou-născuți, cinci posedau cópiile celor două gene, intacte ori modificate, în genomul lor. Timidin-kinaza de la virusul de herpes putea fi de asemenea distinsă la unul dintre animale.

În urma studiilor asupra fecundării și transformărilor suferite de spermatozoid după pătrunderea lui în ovocit, Wagner (Universitatea din Ohio) considera că introducerea ADN-ului străin trebuia să aibă loc exact înaintea

fuziunii celor doi pronuclei, mascul și femel, pentru a se obține cele mai bune rezultate de integrare.

Wagner și Hoppe, de la Jackson Laboratory din Bar Harbour (Maine), au injectat ADN conținînd gena β-globinei de iepure în pronucleul mascul de la șoarece, iar ovulele fecundate au fost, după aceea, cultivate pînă în stadiul de blastocist, înainte de a fi reimplantate în cavitatea uterină a mamelor adoptive. ADN-ul injectat era o plasmidă hibridă, constituită din ADN-ul bacterian și gena β-globinei de iepure, care au fost furnizate cercetătorilor americani de către Flavell, de la National Institute of Medical Research, din Londra, și de către Weissmann, de la Universitatea din Zürich. Erau injectate în ouăle de șoarece fie plasmida hibridă, fie gena β-globinei asociată secvențelor nucleotidice necesare exprimării ei. 20 000 de cópii ale genei de β-globină au fost introduse în fiecare ou de șoarece. În total, au fost tratate astfel 312 ouă iar 211 embrioni rezultați din dezvoltarea lor au fost implantați în uterul a 21 de femele de șoareci adoptive; 11 dintre ele au dat naștere unui număr de 46 de șoricei. Cercetătorii au analizat sîngele acestora din urmă și la cinci dintre ei au găsit β-globina de iepure, dar numai în precursorii hematiilor și nu în alte celule și țesuturi. Acești șoareci sufereau de o ușoară anemie, reglarea sintezei hemoglobinei fiind afectată de prezența genei străine. Împerecherea dintre un mascul și o femelă transformați în felul acesta a dat opt șoricei, dintre care cinci posedau gena β-globinei de iepure și o sintetizau în hematiile lor, deși în concentrații mai mici decît la mamele lor. Aceste experiențe s-au desfășurat între decembrie 1980 și începutul anului 1981, rezultatele de ansamblu fiind publicate în septembrie 1981 (Marx, 1981; Kelly, 1982).

Constantini și Lacy (1981), de la secția de zoologie a Universității Oxford, au injectat în ouă de șoarece un fragment de ADN cromozomial de 29 de kilobaze, conținînd gena β-globinei de iepure și o pseudogenă β (ψβ2). Au fost efectuate hepatectomii parțiale pe 24 șoareci născuți din ouă injectate și ADN-ul celulelor hepatice a fost analizat pentru a fi găsită gena β-globinei de iepure; nouă șoareci conțineau gena aceasta, în proporție de 1 la 20 cópii de celulă. Patru șoareci masculi transformați au fost împerecheați cu femele normale și, din 28 de șoricei din descendența lor, șase conțineau gena β-globinei de iepure. Cercetătorii britanici au confirmat că genele introduse s-au integrat într-un singur loc din zona mediană a cromozomului 1, unde nu se află, de altfel, gena globinei șoarecelui. Așadar avusese loc integrarea genelor străine, dar nu la nivelul pozițiilor genetice analoage (Hogan și Williams, 1981).

Probabil că se va realiza, așadar, integrarea într-un embrion de mamifer a uneia sau mai multor gene, care vor fi funcționale și transmisibile la descendenți. Dar se cade să fie subliniate dificultățile și lipsa de claritate care caracterizează încă acest experiment. Integrarea unei gene în celulele de mamifere se face, într-adevăr, printr-un mecanism destul de puțin cunoscut, iar experiențele realizate au demonstrat că această integrare se producea probabilistic și nu într-o regiune determinată a unui anumit cromozom. O altă dificultate este legată de instabilitatea celulelor în care gena sau genele sînt transferate: acestea pot fi eliminate sau pot suferi modificări care le fac inactive. În sfîrșit, activitatea genelor depinde nu numai de secvențele nucleotidice, care fac posibilă transcripția ADN-ului genei în ARN-mesager (promotori, semnale de inițiere), dar și de alte secvențe nucleotidice adesea foarte îndepărtate de genă și care ar trebui transferate, de asemenea, pentru a se asigura o expresie

totală a acesteia (astfel, activitatea genei α-globulinei, proteină sintetizată de ficat într-o cantitate mai mare sau mai mică după conținutul de cortizon din mediul celular, se află sub controlul unei secvențe de ADN situat în amonte de această genă; s-ar putea spune același lucru despre funcționarea genei β-globinei de hemoglobină).

Experiențele de recombinare genetică în celulele sau embrionii de mamifere vor contribui la o mai bună cunoaștere a mecanismelor reglării activității genelor, ceea ce va înlesni transferul acestora din urmă, și va face expresia lor mai completă în celulele receptoare.

Inserția unei gene străine în regiunea pe care o ocupă în mod normal în genomul celular ar deschide calea reparării anomaliilor genetice, deoarece atunci s-ar putea realiza înlocuirea unei gene active cu o genă absentă ori nefuncțională. Selecția descendenților de șoarece bolnav de α-talasemie (boală a sîngelui care afectează mai multe mii de oameni din întreaga lume) ar trebui să facă posibilă realizarea unor astfel de experiențe, înainte de a proiecta la om inserția de gene destinate să vindece una din cele 2 000 de maladii genetice cauzate de absența ori nefuncționarea unei gene.

Alte domenii de aplicare și interes ale recombinărilor genetice

Noi metode de diagnostic și de cercetare

Tehnicile de recombinare genetică oferă, de asemenea, noi posibilități de diagnostic medical. Într-adevăr, infime cantități de ADN sau ARN virale pot fi izolate, compoziția lor și secvența lor nucleotidică pot fi determinate și replicarea lor realizată. Aceste date relative la acizii nucleici ar permite așadar să distingem diferite categorii de virusuri și aceste tehnici ar deveni unelte prețioase în epidemiologie și în stabilirea diagnosticelor medicale.

Aceste tehnici și în general cele relative la sinteza acizilor nucleici își dau și ele concursul la metodele de cercetare ale funcțiilor cerebrale la nivel molecular. Astfel a fost pusă în evidență prezența hormonilor polipeptidici în creier, după ce s-a demonstrat, în mai multe laboratoare, că antiserurile preparate vis-a-vis de acești hormoni se fixau pe anumite zone ale creierului. Este posibil să fie sintetizate molecule de ADN-copie, ale căror secvențe nucleotidice corespund celei a aminoacizilor hormonilor polipeptidici, apoi acești ADN să fie puși în prezența unor celule nervoase care ar putea să sintetizeze acești hormoni; în acest caz moleculele de ADN se vor uni cu cele de ARN-mesager corespunzător hormonilor; această hibridare între ADN-ul copie și ARN-ul mesager va fi cu atît mai puternică cu cît similitudinea va fi mai mare între hormonii cercetați și substanțele sintetizate în celulele nervoase. Secvența nucleotidică a unor ARN-mesageri va putea fi după aceea analizată, în așa fel încît să se poată stabili eventuale diferențe între hormonii polipep-

tidici cunoscuți și substanțele sintetizate de neuroni. Un asemenea mod de abordare este mult mai rapid decît metodele imunologice clasice, care constau mai întîi în purificarea hormonilor polipeptidici, apoi în prepararea anticorpilor corespunzători, care sînt, după aceea, testați pe creier sau pe celulele nervoase.

Demne de menționat sînt cercetările întreprinse în acest domeniu de către Villa-Komaroff (Școala de medicină a Universității din Massachusetts, din Worcester). După ce a preparat o moleculă de ADN-copie corespunzătoare insulinei de șobolan, ea a încercat să repereze în creierul de șobolan ARN-ul mesager al insulinei, pentru a pune punct controverselor între neurobiologii care foloseau metode imunologice pentru scoaterea în evidență a insulinei în creier. Villa-Komaroff a descoperit că ADN-ul copie se asociază cu două molecule de ARN-mesager în creierul de șobolani adulți, dar că nu era vorba de ARN-ul mesager al insulinei (Kolata, 1982). Împreună cu colaboratorii săi, ea și-a continuat cercetările pe șoricei-nou-născuți și pe fetuși de șoarece pentru a demonstra existența, în creierul acestor animale, a cinci molecule de ARN-mesager, care sînt asemănătoare cu ARN-ul mesager al insulinei; acești ARN lipseau din creierul șoarecilor adulți. În cazul fetușilor umani, Villa-Komaroff a scos în evidență faptul că în creier există doi ARN-mesageri care seamănă cu cei ai insulinei. Rolul peptidelor sintetizate sub controlul acestor ARN-mesageri rămîne însă neclar; Villa-Komaroff considera că este vorba despre niște factori de creștere și că studiul funcției lor biologice poate fi făcut după sinteza lor în celule bacteriene.

Goodman (Massachusetts General Hospital) a încercat, de asemenea, să pună în evidență somatostatina din creier, care este un hormon polipeptidic descoperit inițial în hipotalamus și insulele lui Langerhans ale pancreasului. Acest cercetător a reușit să extragă, din insulele pancreatice de pește-undițar, ARN-ul mesager al somatostatinei, apoi a sintetizat ADN-ul-copie corespondent, datorită căruia a localizat ARN-ul mesager al hormonului în creierul de broască. ADN-ul cópie i-a permis, de asemenea, să izoleze ARN-ul mesager al somatostatinei dintr-o tumoare a măduvei de șobolan; a putut atunci să sintetizeze ADN-ul cópie al somatostatinei de mamifer, care urma să îi permită să o repereze pe aceasta în creierul șobolanului (Kolata, 1982). Cercetări analoage erau legate de localizarea în creierul de șobolan a hormonului de eliberare a hormonului luteinic (LHRH; Roberts, Universitatea Columbia), encefalinei (Herbert, Universitatea din Oregon) și glucagonului (Lund, Massachusetts General Hospital).

Se dovedește așadar că hormonii polipeptidici nu sînt sintetizați numai de glandele endocrine, pentru a fi apoi transportați prin circulația sangvină către organele țintă, ci ei mai pot fi întîlniți și în creier, unde funcția lor exactă rămîne încă de elucidat, mai ales prin noile tehnici din biologia moleculară.

Biomateriale

Protezele și dispozitivele de sprijin, destinate să înlocuiască părți deficiente ale organismului, sau să remedieze disfuncționarea lor, au fost realizate cu ajutorul polimerilor (poliesteri, siliconi, polimetacrilamida de metil, polietilena), al aliajelor metalice (oțeluri inoxidabile, aliaj pe bază de

crom, cobalt și molibden, titan și aliaje pe bază de titan), al ceramicilor (alumină densă, vitroceramici), al materialelor combinate (carbon-carbon, polimeri-fibre de grafit sau de sticlă). La contactul cu aceste materiale diverse se produc reacții ale țesuturilor care fac necesară înlăturarea protezei. Pentru a evita aceste reacții sau pentru a le atenua considerabil a fost creată o nouă categorie de materiale, biomaterialele.

Este vorba de materiale biocompatibile, destinate „să lucreze sub constrîngere biologică" (Jozefonvicz și Jozefowicz, 1982) și prin aceasta adaptate diverselor lor aplicații. Piața biomaterialelor este caracterizată printr-o dezvoltare rapidă: 20% pe an în Franța, de exemplu, cu o cifră de afaceri estimată la 500 000 000 de franci în 1978 (Jozefonvicz și Jozefowicz, 1982).

În domeniul chirurgiei cardiovasculare, cercetările asupra biomaterialelor se orientează către descoperirea de noi mijloace pentru obținerea unor suprafețe de polimeri anticoagulante, de exemplu: polistirenul, polietilena, polizaharidele, pentru realizarea unor înlocuitori avînd proprietățile anticoagulante ale heparinei. Obținîndu-se în felul acesta tuburi de diametru foarte mic, ele vor putea fi utilizate ca punți coronariene pentru tratarea cu mai mult succes a infarctului de miocard.

Folosirea aliajelor metalice în protezele articulațiilor creează probleme, deoarece proprietățile lor mecanice și cele ale osului sînt foarte diferite. Ceramicile, mai ales aluminele arse posedă, în schimb, o biocompatibilitate excelentă, o mare rezistență la uzură, dar fragilitatea lor la șoc este ridicată. Biomateriale cu structura chimică învecinată celei a osului, derivate din fosfați de calciu, hidroxiapatitele, oferă avantajul că pot fi colonizate de celule osoase din cauza structurii lor poroase și a analogiei chimice cu țesutul osos. Din 1974, au început să se fabrice compuși, pe bază de hidroxiapatite, de fosfoaluminați de calciu și de fluoroapatite (Jozefonvicz și Jozefowicz, 1982). Fibrele pe baza compușilor carbon-carbon și plăcile cu rigiditate variabilă făcute din compuși carbon-carbon, epoxi-carbon, polimeri biodegradabili-fibre de carbon sînt chemate să joace un rol important în elaborarea protezelor de tendoane și ligamente. Utilizarea polimerilor biodegradabili (copolimeri ai acidului lactic) ar prezenta avantajul evitării reintervenției chirurgicale necesare pentru scoaterea plăcilor de imobilizare puse la o primă intervenție.

Tot biomateriale noi au făcut posibilă producerea lentilelor de contact fine, flexibile și suple; este vorba de geluri macromoleculare, al căror conținut în apă depășește 80%, ceea ce asigură o bună difuziune a oxigenului și anhidridei carbonice.

Sînt necesare și alte progrese pentru a fi autorizate extinderea folosirii lentilelor, ameliorarea corectării vederii și chiar pentru a fi evitată folosirea cristalinelor artificiale ca urmare a unei cataracte (Jozefonvicz și Jozefowicz, 1982).

În S.U.A., Europa și U.R.S.S. se întreprind cercetări active asupra înlocuitorilor sîngelui: elaborarea unor „celule artificiale" constituite din hemoglobină microîncapsulate în polimeri sintetici; transportori de oxigen pe bază de fluorocarboni; gelatine și dextrani utilizate ca substitut al plasmei sangvine. Dar acești produși nu sînt întotdeauna bine tolerați și, de aceea, se intenționează să se sintetizeze polimeri solubili ușor biodegradabili, după exemplul copolimerilor de acid glicolic și de acid lactic, utilizați pentru efectuarea unor suturi profunde care pot fi bioresorbite în locul catgutului.

Toate aceste cercetări asupra biomaterialelor necesită colaborarea specialiștilor și tehnicienilor care aparțin unor discipline diferite; tehnicile de recombinare genetică și unele procedee biotehnologice pot modifica într-un mod determinant acest domeniu important prin consecințele lui economice, sociale și umane. Aceste cercetări sînt legate de ansamblul cercetărilor și realizărilor care au dat naștere ingineriei biologice și medicale, suport tehnologic indispensabil progreselor medicinei.

Aceste diverse aplicații contribuie la profunda schimbare a medicinei, care nu mai este „arta" de a depista și de a vindeca o boală, ci care se orientează din ce în ce mai mult către prevenirea acesteia, beneficiind de rezultatele cercetărilor biologice legate de apariția și dezvoltarea unor anomalii.

În acest fel descoperirile relative la existența în organismul uman însuși a unui arsenal terapeutic de o mare diversitate și de o extraordinară precizie —cuprinzînd anxioliticele, endorfinele, hormonii și sistemul imunitar-orientează terapeutica pe calea „naturală" care constă în compensarea cu ajutorul acestor substanțe de origine umană a deficiențelor de producere sau de receptare ce explică multe stări patologice. O astfel de farmacologie naturală se deosebește de cea care recurge la produse de origine vegetală, dintre care unele sînt, la urma urmelor, foarte toxice. Ea constă într-adevăr în administrarea, stimularea sau, dimpotrivă, inhibarea hormonilor, enzimelor, mediatorilor chimici, care sînt indispensabile funcționării organismului și ale căror defecte ori dezechilibre sînt răspunzătoare de stările fiziologice deviante și de incidența unui mare număr de maladii. În acest domeniu, contribuția tehnicilor de recombinare genetică este importantă în măsura în care ele fac posibilă sintetizarea acestor hormoni, acestor mediatori sau acestor factori responsabili ai apărării naturale a organismului, cu ajutorul microbilor sau culturilor de celule, evitîndu-se astfel să se facă apel la sinteze chimice complexe și costisitoare.

Elucidarea structurii, organizării și funcționării genomului

Localizarea genelor și hărților cromozomiale

De la studiile întreprinse de Sutton și Boveri la începutul secolului XX, s-a stabilit că cromozomii purtau „factorii ereditari" a căror existență fusese presupusă de Mendel în 1860 și pe care Johannsen i-a numit gene în 1909. Cercetările lui Morgan și ale colaboratorilor săi, mai ales cele ale lui Sturtevant începînd din 1911, au demonstrat că genele sînt organizate în mod linear de-a lungul cromozomilor. S-a dovedit de asemenea că distanța relativă care separă două gene pe un cromozom poate fi dedusă din frecvența recombinării trăsăturilor determinate de aceste gene în descendența celor doi părinți. În același an 1911 o genă anumită, cea a incapacității de distingere a culorilor, a fost localizată de către Wilson, unul dintre colaboratorii lui Morgan (Universitatea Columbia), pe un cromozom, uman, cromozomul X. Numărul cromozomilor umani (22 de perechi de autozomi și o pereche de gonozomi, 2X sau X + Y) a fost stabilit definitiv în 1956 și, din 1968, cercetări active au ca obiect localizarea genelor pe cromozomi și stabilirea unei hărți cromozomiale.

Numărul genelor structurale, și anume al genelor care determină secvențele aminoacizilor din proteine și care nu există decît într-un singur exemplar, ar fi de ordinul a 50 000 la oameni (McKusick și Ruddle, 1977), dar cantitatea de ADN prezentă în nucleu corespunde unui număr de gene de 50—100 de ori mai mare. O proporție însemnată de ADN se află sub formă de secvențe nucleotidice repetitive care ar putea juca un rol reglator, structural sau funcțional în cromozomi.

Peste 900 de locusuri ale genelor au fost determinate prin inventarierea anomaliilor decelate ca urmare a mutațiilor care afectează aceste gene. Cele 50 000 de gene structurale cuprind toate genele care determină structura primară a tuturor enzimelor ce intervin în metabolismul intermediar, ale tuturor proteinelor de structură și ale proteinelor avînd o funcție specifică (de exemplu, hemoglobinele și imunoglobinele), ale anumitor enzime implicate în elaborarea fibrelor de colagen (procolagen-peptidaza, glicozil-transferazele, prolin- și lizin-hidroxilazele, lizil-oxidaza) și ai acizilor nucleici (ADN și ARN-polimeraze). Genele reglatoare ar reprezenta, pe de altă parte, o proporție importantă din cele 50 000 de gene presupuse a exista la om.

Pe cromozomul X au fost reperate peste 100 de locusuri și pe autozomi peste 1 100 de locusuri. Antigeni de histocompatibilitate, localizați pe cromozomul Y (H—Y), au fost puși în evidență la cobai, șoarece și om, și se află, probabil, în vecinătatea centromerului cromozomului Y. Genele responsabile pentru grupele sanguine Rh și ABO se află pe cromozomii 1 și respectiv 9.

Localizarea precisă a genelor pe cromozomi a fost dedusă din cercetările avînd ca obiect studiul familiilor, precum și, mai tîrziu, asupra celulelor hibride provenind din fuziunea celulelor somatice (v. p. 90). Tehnicile de hibridare a acizilor nucleici urmau să fie și o unealtă prețioasă de lucru: astfel au putut fi localizate genele pentru ARN-ribozomal de tip 18S și 28S pe cromozomii 13, 14, 15, 21, 22, iar gena ARN-ului ribozomal 5S a fost localizată pe cromozomul 1. Această tehnică a permis ipoteza că genele lanțurilor α și β ale hemoglobinei se află pe cromozomii 2 și 4 sau 5 (McKusick și Ruddle, 1977). Cercetări avînd ca obiect localizarea cromozomială a genelor histonelor, imunoglobulinelor și colagenului au făcut apel la aceeași tehnică.

Clonarea acizilor nucleici, urmată de hibridarea lor cu segmente de cromozomi, contribuie de asemenea la elucidarea poziției genelor și, prin urmare, la o cartografie precisă a genomului.

Rezultatele acestor cercetări vor avea consecințe însemnate asupra progreselor medicinei, care vor fi în mare măsură condiționate de înțelegerea tot mai aprofundată a funcționării genomului. Multe boli sînt într-adevăr asociate prezenței anumitor gene, în timp ce vindecarea sau prevenirea anomaliilor genetice presupune o cunoaștere amănunțită a organizării, funcționării și reglării genelor.

Structura genelor: introni și exoni

Tehnicile de clonare și de recombinare a ADN-ului au contribuit pe larg la elucidarea structurii genelor celulelor eucariote (Crick, 1979). Cercetările lui Chambon și ale colaboratorilor săi (Laboratorul de Genetică Moleculară a Eucariotelor — Universitatea Louis Pasteur din Strasbourg) sînt

deosebit de demonstrative în această privință (Chambon, 1981). Ei au purificat ARN-ul mesager al ovalbuminei, care este o proteină de 386 de aminoacizi, pornind de la celulele oviductului de găină. Din 1 872 de nucleotide care constituie acest ARN-mesager, 1 158 sînt responsabile cu sinteza celor 386 de aminoacizi ai proteinei, în timp ce 64 de nucleotide la extremitatea 5′ și 650 de nucleotide la extremitatea 3′ a moleculei de ARN nu au fost translate. ARN-ul mesager a servit la elaborarea unui ADN-copie care reprezenta gena ovalbuminei și care putea fi așadar recombinat cu o plasmidă și clonat în colibacil.

Cercetătorii francezi puteau să studieze, în continuare, și structura acestuia deoarece aveau la dispoziție material în cantitate suficientă. Acest

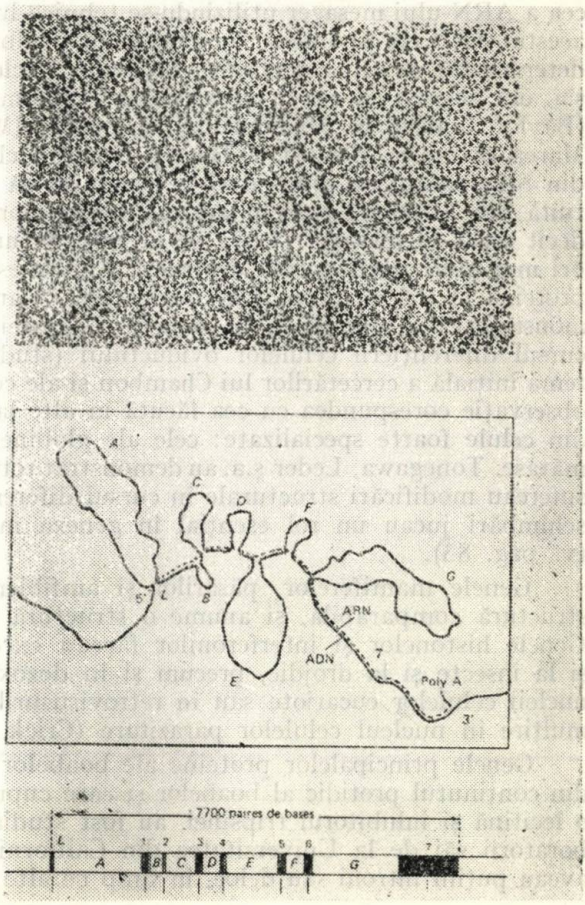
Structura genei de ovalbumină.

Microfotografia electronică și schema centrală reprezintă un fragment din molecula de ADN corespunzător genei ovalbuminei albușului de ou de găină, care a fost supus hibridării cu ARN-ul mesager al acestei proteine.

Puterea de mărire a acestei fotografii este de aproape 180 000. Hibridarea între ADN și ARN se referă la regiunile complementare ale celor două molecule, care formează așadar un lanț bicatenar. Aceste regiuni complementare sînt reprezentate pe schema din centru: ADN-ul cu linie continuă și ARN-ul cu linie punctată. Ele corespund pe ADN unui număr de opt exoni (*L*, *1*—*7*). Segmentele de ADN care nu au segmente complementare pe molecula de ARN mesager formează bucle — șapte la număr — care sînt intronii genei ovalbuminei.

Sînt indicate cele două extremități ale ARN-ului mesager (*5′* și *3′*), precum și o scurtă secvență de ribonucleotide pe bază de adenină sau poli-A, la nivelul extremității *3′*. Schema de jos reprezintă structura completă a genei ovalbuminei, care cuprinde deci șapte introni (*A*—*G*) și opt exoni (*L*, *1*—*7*) al căror număr de perechi de baze este indicat sub fiecare dintre ele. Mărimea intronilor variază între 251 de perechi de nucleotide (*B*) și 1 600 (*G*). Întreaga genă a ovalbuminei cuprinde 7 700 de perechi de nucleotide (baze).

Gena ovalbuminei este mai întîi transcrisă într-o moleculă de ARN, din care au fost excizate segmentele corespunzătoare intronilor genei; segmentele care corespund exonilor genei sînt apoi unite pentru a constitui molecula de ARN mesager care va fi tradusă într-o moleculă de ovalbumină.



]Foto: P. Chambon, Universitatea Louis-Pasteur, Strasbourg, Franța.

In: *Scientific American* (New York), vol. 244, nr. 5, 1981, p. 49.]

ADN-copie nu era clivat de două enzime de restricție, Eco RI și Hind III, deci el nu conținea nici una dintre cele două secvențe nucleotidice, avînd fiecare șase perechi de nucleotide și recunoscute de aceste enzime. Începînd de la sfîrșitul anului 1977, ipoteza luată în considerare de acești cercetători a fost că ADN-ul care era transcris în ARN-mesager al ovalbuminei era întrerupt de segmente ce nu se regăseau în ARN-ul mesager.

O astfel de ipoteză a fost emisă, vorbind despre mamifere, în cazul genelor β-globinei cît și al genelor anumitor lanțuri ușoare *kappa* și *lambda* ale imunoglobulinei de șoarece, și ale unui lanț greu al unei imunoglobine a aceleiași specii de rozător (Leder, National Institute of Child Health and Human Development, în S.U.A.; Tonegawa, Institul de imunologie din Bâle; în Crick, 1979). Carey și colaboratorii săi din laboratoarele Searle, în Marea Britanie, au ajuns și ei la concluzia că gena ovalbuminei era întreruptă.

Cercetările efectuate de Chambon și Kourilsky (Institutul Pasteur, Paris) urmau să demonstreze, după aceea, că ADN-ul ovalbuminei nu se încrucișa prin hibridare decît parțial cu ARN-ul mesager al acestei proteine: șapte regiuni din acest ADN nu își aflau secvențe complementare în ARN și aceste regiuni netranscrise sau introni decupau ADN-ul transcris în opt fragmente sau exoni. Secvența nucleotidică a acestor exoni a fost apoi comparată cu cea a ARN-ului mesager utilizîndu-se tehnica lui Maxam și Gilbert, și codonii acestui ARN corespundeau aminoacizilor ovalbuminei a căror secvență fusese determinată de alți cercetători. Secvența nucleotidică stabilită de Chambon ș.a. era aceeași cu cea a mesagerului ovalbuminei, determinată de O'Malley (Baylor College of Medicine) și Brownlee (Medical Research Council din Marea Britanie). Benoist, O'Hare și Breathnach (Universitatea Louis-Pasteur din Strasbourg) au ajuns deci la concluzia că gena ovalbuminei este constituită din 7 700 de perechi de nucleotide, aproape de patru ori mai multe decît ARN-ul mesager (1 872 de perechi de nucleotide) și aproape de șapte ori mai mult decît partea din acest ARN-mesager translată în mod real în proteină (1 158 de perechi de nucleotide). Gannon, Perrin și Jeltsch au demonstrat ceva mai tîrziu că structura acestei gene nu suferă schimbări în cursul diferențierii celulelor oviductului (studiul acestei diferențieri a fost tema inițială a cercetărilor lui Chambon și ale colaboratorilor lui). O asemenea observație corespundea cu cea făcută în alte laboratoare în legătură cu gene din celule foarte specializate: cele ale globinei și ale fibroinei viermilor de mătase. Tonegawa, Leder ș.a. au demonstrat totuși că genele imunoglobulinelor sufereau modificări structurale în cursul diferențierii limfocitelor și că aceste schimbări jucau un rol esențial în geneza marii diversități a anticorpilor (v. pag. 83).

Genele mamiferelor, păsărilor și amfibienilor analizate aveau toate o structură comparabilă, și anume o structură formată din exoni și introni. Genele histonelor și interferonilor făceau excepție. Gene cu introni există și la insecte și la drojdie, precum și în dezoxiribovirusurile care se află în nucleii celulelor eucariote sau în retrovirusurile care prezintă o fază de înmulțire în nucleul celulelor parazitare (Crick, 1979).

Genele principalelor proteine ale boabelor de soia, care constituie 80% din conținutul protidic al boabelor și care cuprind două proteine de rezervă, o lecitină și inhibitorul tripsinei, au fost studiate de către Goldberg și colaboratorii săi de la Universitatea din California (Los Angeles). Aceste gene aveau puțini introni sau deloc, în timp ce alte gene, care nu erau exprimate

în boabele de soia și ai căror ARN-mesageri erau sintetizați în cantități mici, erau întrerupte de mai mulți introni și care ar fi, după cum susține Goldberg, mai reprezentative pentru structura genelor vegetale superioare (Marx, 1982).

În afara frecvenței relativ ridicate a intronilor (2—7) în anumite gene, este importantă mărimea lor, aceasta fiind cuprinsă între 100 și cîteva mii de perechi de nucleotide; în general, intronii sînt mai lungi decît exonii. Chambon ș.a. au numărat pînă la 16 introni în gena ovotransferinei de găină, în timp ce Schimke (Universitatea Stanford) a demonstrat că o genă de șoarece era de 20 de ori mai lungă decît ARN-ul mesager. Această structură caracterizează și genele răspunzătoare de sinteza ARN-ului ribozomal al drosofilei (Hogness, Stanford University School of Medicine). Gena unică a ARN-ului ribozomal (ARNr) al mitocondriilor de drojdie pare să conțină un intron (Crick, 1979). Intronii ARN-ului de transfer ai drojdiei sînt foarte scurți, deoarece ei au 14, 28, 29 și 34 de nucleotide (Schaffner ș.a., 1978, Crick, 1979).

O'Malley, pe de o parte, și Chambon ș.a., pe de altă parte, au pus în evidență, în nucleul celulelor oviductului de găină, molecule de ARN la fel de lungi ca gena ovalbuminei, dar și molecule mai scurte, ceea ce indica o disecare ori excizie (splicing) a ARN-ului mesager pînă în stadiul celui care trebuia translat în ovalbumină. Acest proces are loc numai în nucleu. El este definit ca mecanismul care permite obținerea unei molecule de ARN funcționale după ce s-au eliminat unul sau mai multe fragmente ce se află în interiorul moleculei produse inițial. Această eliminare nu interesează numai ARN-mesageri, ci și anumiți ARN de transfer ai drojdiei, deși intronii lor sînt de mărime mică (Goodman ș.a., 1977; Valenzuela ș.a., 1978; în Crick, 1979). Slonimski (Gif-sur-Yvette, Franța) a sugerat, după cercetările întreprinse asupra transcripției în ARN-mesager a genei citocromului *b* al mitocondriei drojdiei, că anumiți introni puteau fi excizați cu ajutorul enzimelor sau „maturazelor" a căror producere se află sub controlul intronilor înșiși (Minty și Newmark, 1980).

În colaborare cu Kourilsky, cercetătorii din Strasbourg au demonstrat că gena albuminei face parte dintr-o familie de trei gene asemănătoare și intim asociate. Pentru aceasta ei au utilizat un alt tip de vector de clonare, „cosmidele", elaborate de Collins (Society for Biotechnological Research, R.F.G.) și Hohn (Universitatea din Bâle), și care combină caracterele plasmidelor și ale bacteriofagului *lambda*. A fost astfel posibilă clonarea unor segmente de ADN ale genomului celulelor oviductului de găină avînd aproape 40 000 de perechi de nucleotide, corespunzător genei ovalbuminei, dar și altor două gene, X și Y. Chambon ș.a. au calculat, bazîndu-se pe diferențele care există între secvențele acestor trei gene și frecvența admisă a mutațiilor, că gena ovalbuminei s-a format prin duplicare în urmă cu 50 milioane de ani. Familia genelor globinei este un alt exemplu al conservării remarcabile în cursul evoluției structurii exoni-introni. Secvențele genelor α- și β-globinei, care s-au format prin duplicare în urmă cu aproape 500 milioane de ani, erau întrerupte de doi introni aflați în poziții identice în cele două gene.

Secvențele exonilor ar fi evoluat lent, prin mijlocirea mutațiilor punctiforme care afectează de fiecare dată un nucleotid, în timp ce intronii ar fi evoluat mai rapid, ca urmare a delețiilor sau inserțiilor de mărime variabilă. Aceste gene sînt constituite, așadar, din elemente stabile răspunzătoare de sinteza proteinelor, plasate într-un mediu mult mai instabil și care reprezintă,

în cazul regiunii ovalbuminei, aproape 91% din ADN (doar 9% din acest ADN de 40 000 de perechi de nucleotide sînt răspunzătoare de sinteza aminoacizilor). Aceasta ar explica, într-o foarte mare măsură, diferența între mărimea genomului eucariotelor și numărul genelor funcționale.

Mecanismul disecării ARN-ului sintetizat inițial plecînd de la ADN pare răspîndit universal la eucariote și probabil că ar fi existat în prima celulă eucariotă. Faptul că anumite gene de eucariote și cele ale procariotelor nu prezintă introni, nu înseamnă că acestea din urmă au apărut în cursul evoluției în sînul unor genomuri constituite din gene continue. Aceste gene continue au putut fi întrerupte, apoi intronii au putut fi eliminați. Deși excizia precisă a unui intron este considerată ca un eveniment rar, Gilbert ș.a. au demonstrat căaceastă excizie s-a produs într-una din genele insulinei la șoarece.

După Chambon, procariotele actuale nu au fost strămoșii celulelor eucariote. Ele ar fi mai degrabă descendenții unor celule care, în cursul evoluției, ar fi eliminat, în mod progresiv, ADN-ul lor în exces, care nu codifica proteine, avînd drept consecință o creștere a vitezei lor de dezvoltare, din cauza reducerii cantității de ADN de care aveau nevoie pentru a se replica în fiecare generație; o dată eliminați intronii, mecanismul exciziei devenea inutil. În celulele eucariote, în schimb, acest mecanism trebuia să fie perfecționat și le dădea posibilitatea să exploreze noi tendințe evolutive. În măsura în care celulele organismelor eucariote nu au nici un mijloc să elimine introni, aceștia din urmă se conservă și, după părerea lui Chambon, ei reprezintă relicve pentru același motiv, ca și alte segmente de ADN cărora nu le-a fost atribuită o funcție anume. Dar secvențele intronice pot să ofere anumite avantaje: Gilbert a lansat ideea că prezența intronilor făcea să crească frecvența recombinărilor exonilor aceleiași gene; aceasta înseamnă că exoni mutanți deosebit de favorabili și prezenți în diferite alele ale unei gene au mai multe șanse de a fi recombinate, dînd apoi o nouă alelă de două ori mai avantajoasă. Cercetările întreprinse în prezent vor permite poate descoperirea altor funcțiuni ale acestor introni, în raport cu organizarea și funcționarea genomurilor organismelor eucariote.

Este foarte probabil că aceste cercetări legate de diversele modificări pe care le suferă moleculele ARN-mesager înainte de a părăsi nucleul pentru a trece în citoplasmă vor permite să se cunoască mecanismele biochimice ale acestora, dar aceste descoperiri nu trebuie să facă să se uite faptul că procesul fundamental de elucidat cu prioritate este cel al transcripției ADN-ului în ARN-mesager și al controlului acestui proces. Orice proces însemnat în acest domeniu va face într-adevăr să avanseze temeinic cunoștințele noastre despre structura genelor, despre reglarea funcționării lor și despre evoluția lor la eucariote.

În această privință, se pare că majoritatea genelor celulelor eucariote care sînt transcrise de ARN-polimeraza-II posedă în comun o secvență de aproape 30 de nucleotide, situate în amonte de locul unde începe transcripția. Această secvență este bogată în nucleotide care conțin adenina (A) și timina (T), și este, în general, desemnată prin expresia „cutia TATA" sau „Cutia lui Goldberg-Hogness", de la numele celor doi cercetători americani de la Universitatea Stanford care au descoperit-o în 1979.

Importanța acestei secvențe nucleotidice pentru transcripția *in vitro* a genelor a fost demonstrată de Chambon (Universitatea Louis-Pasteur, Strasbourg) în cazul genei conalbuminei de găină, de Tsai (Houston) în cel al ovalbuminei, și de Flavel (National Institute for Medical Research, Londra)

în cel al β-globinei: eliminarea acestei secvențe avea ca efect întreruperea sau reducerea, în mod considerabil, a transcripției; o mutație în centrul acestei secvențe avea consecințe analoage (Minty și Newmark, 1980). Dacă era vorba despre transcripția *in vivo*, rezultatele mai multor echipe de cercetători demonstrau că alte secvențe nucleotidice, situate mai în amonte de cutia TATA, aveau influență asupra transcripției ADN-ului în ARN cu ajutorul ARN-polimerazei II; deleția acestor secvențe avea, într-adevăr, drept urmare o micșorare foarte clară a transcripției *in vivo*; spre deosebire de cazul transcripției *in vitro*. Chambon a demonstrat că o asemenea secvență se afla la o depărtare de aproape 100 de perechi de nucleotide de cutia TATA a virusului SV40 (în Minty și Newmark, 1980); la gena histonei H2A, Hentschel a constatat că deleția unui segment de ADN situat între 184 și 520 de perechi de nucleotide în amonte de situsul inițierii micșora transcripția acestei gene în proporție de 15—20 de ori (Minty și Newmark, 1980).

Rearanjarea genelor și diversitatea genetică: genele anticorpilor

După ce s-a admis că ansamblul genomului celulelor embrionare rămînea neschimbat în cursul diferențierii acestor celule somatice care dau naștere diverselor țesuturi din organism, că formele și funcțiunile distincte ale celulelor diferențiate se datorau expresiei diferite a aceloraşi gene, specialiștii în genetică și biologie moleculară au pus în discuție aceste principii în urma cercetărilor făcute asupra sistemului imunitar al mamiferelor. Aceste cercetări au arătat într-adevăr că vreo cîteva sute de gene din celulele care se află la originea limfocitelor suferă restructurări pentru a ajunge la extraordinara diversitate a moleculelor de anticorpi produse de limfocitele diferențiate. Aceste restructurări în interiorul genomului fac posibilă obținerea unei diversități genetice superioare celei a unui genom invariabil și ele ar putea să fie produse și în alte celule decît în limfocite. Aceste studii au făcut apel la tehnicile de izolare, hibridare și de clonare a acizilor nucleici, și au beneficiat de datele noi relative la structura genelor de eucariote. Ele au adus, de asemenea, dovada că recombinarea ADN-ului, care permitea specialiștilor de inginerie genetică să modifice genomul unei celule pentru a orienta metabolismul ei către producerea unei substanțe determinate, putea să se desfășoare în mod firesc chiar în interiorul acestui genom și putea să ducă la o mare diversitate genetică și metabolică, adică la specializarea celulară.

O moleculă de anticorp este rezultatul asocierii cîtorva lanțuri de proteine; de vreme ce sinteza unei proteine este guvernată de o genă, s-ar putea presupune că există milioane de gene corespunzătoare numărului considerabil de molecule de anticorpi produse de organismul unui mamifer. Or genomul acestuia din urmă cuprinde în jur de un milion de gene * în total, dintre care o foarte mică parte conduce sinteza anticorpilor. Răspunsul la un asemenea paradox — un număr limitat de gene răspunzătoare de extraordinara diversitate a anticorpilor produși de un organism — este că celulele germinale sau celulele embrionare nu conțin ansamblul complet al tuturor genelor de anticorpi, ci mai degrabă un ansamblu de elemente genetice susceptibile să suporte, în cursul diferențierii și maturării celulelor sistemului

* După estimările actuale, numărul de gene la mamifere este de numai cîteva zeci de mii (Nota redacției).

imunitar, limfocitele B, rearanjări care duc la rezultate diferite în fiecare dintre milioanele de linii celulare. Această diversitate se amplifică și mai mult datorită mutațiilor care afectează genomul. În celulele diferențiate ale fiecărei linii se află o genă cu o structură determinată și informația genetică pe care o conține va fi exprimată într-un anticorp anume.

Molecula de anticorp este formată din două perechi de lanțuri protidice de două tipuri, lanțuri ușoare și lanțuri grele. Fiecare dintre lanțuri posedă o regiune numită variabilă (care corespunde aproape unei jumătăți din lungimea unui lanț ușor și unui sfert din cea a unui lanț greu) și o regiune numită constantă. Regiunile variabile ale celor două tipuri de lanțuri sînt cele care conțin, în interiorul unei structuri particulare, situl de combinare între anticorpul și antigenul contra căruia a fost sintetizată molecula de anticorp. Modificînd structura aminoacizilor regiunilor variabile, se schimbă structura acestui sit precum și afinitatea între antigen și anticorp.

La majoritatea vertebratelor, există două tipuri de lanțuri ușoare, *kappa* și *lambda* și fiecare moleculă de anticorpi posedă unul sau celălalt tip de lanțuri. Regiunea constantă a unui lanț *kappa* sau *lambda* este identică cu cea aparținînd altor lanțuri de același tip ale oricărei specii. Lanțurile grele sînt de cinci tipuri: *miu*, *delta*, *gamma*, *epsilon* și *alfa*. Aceste cinci tipuri sînt cele care definesc cele cinci clase de imunoglobuline prezente la mamifere: IgM, IgD, IgG, IgE, și IgA. În anticorpii clasei IgM, de exemplu, toate lanțurile grele au aceeași regiune constantă *miu* și lanțurile ușoare au aceeași regiune constantă *kappa* sau *lambda*; regiunile lor variabile diferă, în schimb, de la o moleculă la alta și traduc în fapt diversele lor afinități antigenice. Regiunile constante ale lanțurilor grele determină modul de acțiune al anticorpului în organism: dacă este vorba de tipul *delta*, anticorpul IgD este asociat la suprafața celulei care îl produce; dacă este vorba de tipul *gamma*, anticorpul IgG este un anticorp care circulă în sînge; dacă este vorba de tipul *epsilon*, anticorpul IgE va putea să se fixeze la suprafața unei celule specializate, care eliberează histamină, avînd drept urmare unele simptome de astm sau de febră cînd anticorpul reacționează cu antigenul (polen de exemplu).

Pe la mijlocul anilor '60, Dreyer și Bennett (California Institute of Technology) au emis o ipoteză revoluționară: în locul presupunerii că informația genetică corespunzătoare a unui lanț ușor al unui anticorp se prezenta sub forma unei succesiuni continue de nucleotide, ei au considerat că această informație se afla repartizată în două segmente discontinue de ADN, unul pentru regiunea variabilă și celălalt pentru regiunea constantă. Ei au sugerat pe deasupra că trebuiau să existe mai multe sute sau mii de gene separate corespunzînd regiunilor variabile în celulele germinale, dar numai o genă pentru regiunea constantă.

În 1971, Leder și Swan (National Institute of Child Health and Human Development) au încercat să verifice ipoteza lui Dreyer și Bennett, izolînd ARN-ul mesager al unei gene de anticorp, apoi fabricînd ADN-ul copie corespondent cu ajutorul transcriptazei inverse și folosind acest ADN ca pe o „sondă" pentru a pune în evidență prezența genelor acestui anticorp în celulele embrionare și pentru a stabili numărul lor. ADN-ul copie utilizat ca „sondă" a fost sintetizat pornind de la ARN-ul corespunzător regiunii constante a unui lanț ușor al anticorpului de șoarece. Cei doi cercetători americani împreună cu Honjo (Universitatea din Kyoto) au demonstrat că există numai un număr mic de gene din această regiune constantă în celulele embrionare,

nu mai mult de două de celulă. Alți cercetători au obținut rezultate analoage, care începeau să confirme ipoteza lui Dreyer și Bennett.

Dacă în celulele embrionare ar exista un număr foarte mic de gene ale regiunii constante și mai multe gene separate ale regiunii variabile, cel mai simplu mijloc de a reuni această informație într-o secvență coerentă ar fi la nivelul genei, de a reînnoda două secvențe distincte de ADN într-una singură în cursul diferențierii celulelor embrionare în limfocite. Este vorba despre o recombinare somatică a ADN. Tonegawa și Hozumi (Institutul de de Imunologie din Bâle) au comparat apoi structura ADN-ului din celule embrionare de șoarece cu cea a ADN-ului celulelor unui plasmacitom (tumoare a limfocitelor B care produce anticorpi de un singur tip și cu o specificitate aparte). Dacă ADN-ul genelor anticorpilor ar fi suferit, în cursul diferențierii celulare, o recombinare somatică, structura sa ar trebui să fie diferită de cea a celulelor embrionare. Tonegawa și Hozumi au constatat, într-adevăr, că genele lanțurilor ușoare nu au aceeași organizare în cele două tipuri de celule și că se produc multe schimbări în interiorul acestei organizări în cursul diferențierii celulare (Leder, 1982). Acești cercetători au descoperit după aceea că gena regiunii constante și genele regiunii variabile ale lanțurilor *lambda* în cazul șoarecelui se aflau foarte departe unele de altele în celulele care nu produceau anticorpi, în timp ce într-o celulă de plasmacitom ele erau mult mai apropiate. Rearanjarea nu avea drept urmare punerea în contact a acestor două tipuri de gene pentru a forma o secvență continuă: gena V* (a regiunii variabile) se afla la aproape 1 500 de nucleotide de gena C (a regiunii constante); între cele două și alăturat genei V se află un segment J (joining sequence).

Leder și colaboratorii săi au studiat genele lanțurilor ușoare *kappa* de șoarece, deoarece 90% din anticorpii acestei specii posedau acest tip de lanț ușor. Ei au reușit să cloneze genele regiunilor constantă și variabile ale acestor lanțuri, după ce le izolaseră în celule embrionare și în celule diferențiate; ei au determinat, după aceea, secvențele nucleotidice ale acestor gene prin tehnica lui Maxam și Gilbert (în Leder, 1982). Rezultatele acestor cercetări și ale celor făcute de Perry (Institute for Cancer Research, din Fox Chase, Pennsylvania) au condus la concluzia că în ADN-ul celulelor embrionare de șoarece există mai multe sute de gene ale regiunilor variabile ale lanțurilor ușoare *kappa* sau *lambda*. Fiecare din aceste gene V se divide în două segmente separate printr-o secvență intermediară scurtă; primul segment determină sinteza unui lanț hidrofob de 17—20 de aminoacizi, care ar juca un rol important în transferul moleculei de anticorp prin membrana celulară (el este detașat de lanțul polipeptidic cînd anticorpul traversează această membrană); cel de al doilea segment al genei V guvernează sinteza celei mai mari părți a regiunii variabile a lanțului ușor (95—108 aminoacizi); restul regiunii variabile este sintetizat sub controlul unei secvențe nucleotidice plasată în aval de gena V, lîngă gena regiunii constante (C), acolo unde gena V se unește pentru a forma o genă activă de imunoglobulină. Această scurtă secvență, gena J, se repetă de cinci ori la intervale de aproximativ 300 de nucleotide, cu ușoare, dar semnificative, schimbări.

---

* De fapt nu este vorba de gene V, gene C, gene Y etc. ci de segmente de ADN care se recombină pentru a da naștere unei gene funcționale (Nota redacției).

Deci dacă într-o celulă embrionară se află aproape 150 de gene V, unirea uneia dintre ele cu una din cele cinci gene J va putea da 150 × 5 = 750 gene diferite corespunzînd regiunii variabile a lanțului ușor. Rezultatele obținute de mai multe echipe de cercetători indică faptul că rearanjarea se face în felul următor: una dintre genele V se unește cu una din genele J și genele V și J suplimentare sînt eliminate (ca și lungile secvențe intermediare care nu sînt transcrise); gena activă este constituită în final din trei segmente, un prim segment scurt (leader, L) răspunzător de sinteza polipeptidului hidrofob, genele V și J, și gena C. Transcripția acestei gene este urmată de excizarea ribopolinucleotidului pentru a da ARN-ul mesager care va fi translat într-un lanț ușor *kappa* (fig. 4). Diversitatea poate fi sporită printr-o altă sursă de variație: genele V și J se pot uni în diferite puncte, în așa fel încît codonul corespunzător aminoacidului cu numărul 96 din lanțul ușor (la nivelul

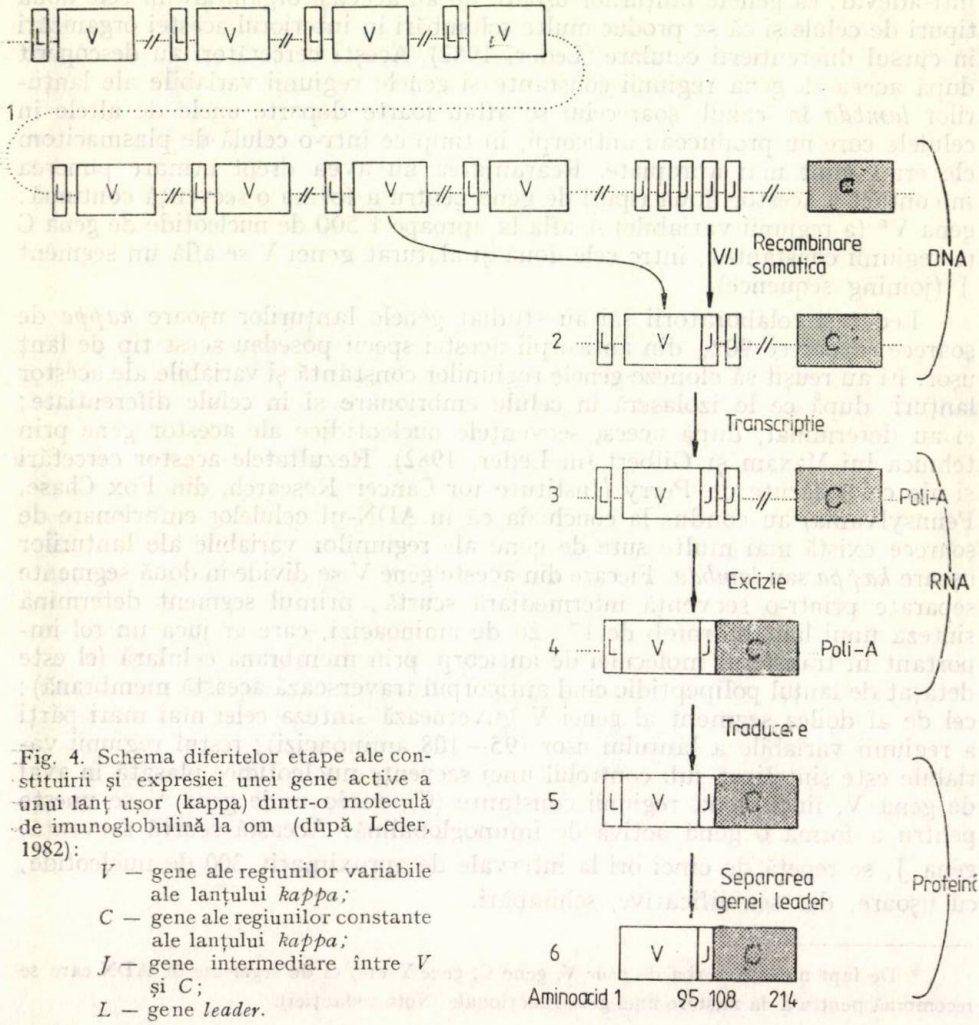


Fig. 4. Schema diferitelor etape ale constituirii și expresiei unei gene active a unui lanț ușor (kappa) dintr-o moleculă de imunoglobulină la om (după Leder, 1982):

V — gene ale regiunilor variabile ale lanțului *kappa;*
C — gene ale regiunilor constante ale lanțului *kappa;*
J — gene intermediare între *V* și *C*;
L — gene *leader*.

căruia se unesc cele două gene V și J) și codonii adiacenți se pot schimba în funcție de modalitățile sudurii genelor V și J. Această zonă din jurul codonului corespunzător aminoacidului cu numărul 96 este una din cele trei zone hipervaribile ale regiunii variabile a lanțului ușor, care participă la configurația sitului de combinare între antigen și anticorp. Presupunînd că diferitele modalități de sudură între genele V și J pot să-și înzecească diversitatea, numărul total al combinărilor posibile între genele V și J se ridică la 7 500.

Prețul unei asemenea diversități este formarea eventuală a genelor inactive ca urmare a unei asocieri aberante între genele V și J, ceea ce ar explica în parte fenomenul excluderii alelice. Fiecare celulă somatică posedă două loturi de cromozomi provenind de la cei doi părinți și copiile unei anumite gene pe cei doi cromozomi aparținînd fiecărui lot poartă numele de alele. Într-o celulă producătoare de anticorpi, numai genele anticorpilor aflați pe un cromozom suferă în general recombinarea somatică și sînt în final traduse în proteine; alelele care se află pe cromozomul omolog sînt în general excluse dintr-un asemenea proces de recombinare și deci ele nu sînt exprimate. Se întîmplă totuși ca o celulă producătoare de anticorpi să posede două seturi de gene active recombinate.

În cazul lanțurilor grele, aceleași principii se aplică la formarea regiunilor variabile, dar diversitatea este și mai mare decît în cazul lanțurilor ușoare. Rabbitts și colaboratorii săi (Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, de la Cambridge) au estimat că numărul de gene V al lanțurilor grele în celulele embrionare umane se ridică la 80. Ravetch a găsit șase gene J în mijlocul a 8 000 de nucleotide ale genei C a tipului de lanț greu *miu*. În sfîrșit, o scurtă secvență aflată la joncțiunea genelor V și J introduce o diversitate suplimentară; presupunînd că ar exista, la om, cincizeci de familii din această genă D (diversitiy), recombinarea somatică a genelor regiunilor variabile din lanțurile grele ar ajunge la $80 \times 6 \times 50 = 24\,000$ de combinații. Un factor suplimentar de variație, considerat a fi 100, privește zonele de recombinare dintre genele V/D și genele D/J. Numărul total al lanțurilor grele care ar putea fi sintetizate ar fi atunci 2,4 milioane. În total, prin combinarea posibilităților oferite de cele două tipuri de lanțuri, s-ar ajunge la 18 miliarde de anticorpi, care ar putea fi produse pornind de la 300 de segmente ale ADN-ului celulelor embrionare. Această extraordinară diversitate genetică poate fi sporită și mai mult cu ajutorul altui mecanism decît recombinarea somatică: mutația somatică. Genele imunoglobulinelor sînt într-adevăr capabile să suporte mutații cu o frecvență remarcabilă de 1/10 000 de celule per generație (Leder, 1982).

Organizarea genelor lanțurilor grele în ADN-ul celulelor embrionare de șoarece, repartizate pe mai mult de 100 000 de nucleotide, a fost elucidată de mai multe echipe de cercetători: cercetările lui Hood (California Institute of Technology) și de Tonegawa (Institutul de Imunologie din Bâle) au avut ca obiect structura genelor *miu*, *gamma* și *alfa*; cele întreprinse de Blattner (Universitatea din Madison, statul Wisconsin) — localizarea genei delta; Honjo (Facultatea de Medicină a Universității din Osaka) a reușit să cloneze și să cartografieze genele *gamma* (există într-adevăr patru subclase de IgG), apoi să le unească unele cu altele, precum și cu genele *epsilon* și *alfa*. Organizarea acestor gene (din amonte spre aval sau de la extremitatea 5' la extremitatea 3' a secvenței polinucleotidice) era următoarea: *miu*, *delta*, *gamma* 3, *gamma* 1, *gamma* 2*b*, *gamma* 2*a*, *epsilon* și *alfa* (Leder, 1982).

În concepția lui Leder (1982), formarea anticorpilor se desfășoară în felul următor: în celulele care se diferențiază în limfocite B sau prelimfocite B, regiunea constantă a unui lanț greu de tip *miu* este mai întîi sintetizată, apoi asociată unei regiuni variabile specifice (rezultatul recombinării somatice între genele V/D/J); după sinteza lanțurilor ușoare și a lanțurilor grele de tip *delta*, unirea lanțurilor grele și ușoare duce la formarea moleculelor complete ale anticorpilor din clasele IgM și IgD. Stadiul următor al diferențierii limfocitelor este caracterizat prin apariția simultană a anticorpilor IgM și IgD la suprafața celulelor; cei doi anticorpi posedă aceeași regiune variabilă și deci ei sînt dirijați către același antigen. Stadiile ulterioare ale maturării limfocitelor par să fie influențate de antigen: acesta din urmă se leagă de un receptor, adică de unul din siturile cel mai bine adaptate dintre milioanele sau miliardele de imunoglobuline care se află la suprafața limfocitelor; ca urmare a acestei interacțiuni, celula care posedă imunoglobulina selecționată proliferează pentru a da un clon de limfocite B specializate în producerea acestui tip de anticorp (selecția clonală). În cursul maturării limfocitelor B, imunoglobulinele IgD și IgM dispar de la suprafața celulară și celulele secretează atunci imunoglobulinele IgM, IgG, IgE sau IgA. Fiecare din aceste clase de imunoglobuline posedă o regiune constantă a unui lanț greu diferit, dar anticorpii fiecărei clase sintetizați într-o celulă determinată posedă aceleași regiuni variabile, și anume regiunile care, elaborate în prelimfocite, au contribuit la formarea sitului de combinare selecționat de antigen.

Fuziunea de celule somatice

În 1960, Barski, Sorieul și Cornefort (Laboratorul de Virusologie și Cultura Țesuturilor al Institutului Gustave-Roussy, din Villejuif, France) au observat în cursul experiențelor lor de cultură mixtă a două linii de celule tumorale de șoarece, formarea unui nou tip, care prezenta caractere morfologice și un mod de creștere diferite de cele ale celulelor parentale. Nucleele acestor noi celule conțineau, pe deasupra, un număr de cromozomi egal cu suma seturilor cromozomiale ale celulelor parentale, precum și markeri cromozomici caracteristici ai acesteia. Aceste observații au fost confirmate de Ephrussi ș.a. (1964) și extinse la alte tipuri de celule necanceroase de șoarece. Frecvența fuziunii celulare rămînea destul de scăzută, de ordinul a 10^{-4} — 10^{-6}, dar Okada (1958, 1962) a reușit să sporească frecvența fuziunii celulelor animale tumorale prin folosirea virusului japonez al hemaglutinării (HVJ). Okada și Tadokoro (1962) au demonstrat că virusul putea fi complet inactivat prin iradiere cu ultraviolete și putea să-și conserve puterea de a induce fuziunea celulară; orice complicație rezultînd din folosirea unui virus infecțios, putea fi astfel evitată. Harris și Watkins (1965) au atras atenția asupra lucrărilor cercetătorilor japonezi și ei au fost primii care au folosit virusul Sendaï, inactivat pentru a induce fuziunea celulelor tumorale de șoarece. Virusul HVJ aparține grupei mixovirusurilor și se aseamănă mult cu virusul Sendaï. Harris ș.a. (1965, 1966) au demonstrat apoi că fuziunea somatică se putea produce între celulele care aparțin unor ordine diferite de vertebrate.

Weiss și Green (1967) au constatat că, în celulele hibride „om-șoarece", cromozomii umani erau în mare măsură eliminați după fuziune. În timp ce fuziunea între celule umane și celule de rozătoare era în general urmată de pierderea cromozomilor umani, cea care intervenea între celule de maimuță și celule de șoarece era însoțită de eliminarea ulterioară a cromozomilor de maimuță. În cazul fuziunilor celulare interspecifice se observă în general pierderea de cromozomi a uneia dintre liniile parentale, ceea ce făcea hibrizii deosebit de utili pentru analiza genetică. Hibrizi celulari somatici au fost obținuți ca urmare a unirii celulelor umane HeLa cu celule de *Aedes aegypti*, sau a celulelor de șoarece cu cele de găină.

Această fuziune somatică s-a realizat cu agenți de fuziune deosebiți de virusul Sendaï — cum este polietilenglicolul — între celule animale și vegetale din specii diferite (Cocking; Davies, 1981).

Hibridomi

Răspunsul imunitar al un antigen specific este deosebit de eterogen: un antiser conține un amestec de anticorpi. Aceștia din urmă sînt produși de către diferitele linii de limfocite B și corespund diverselor grupuri antigenice ale antigenului. Dacă s-ar putea izola o linie specială de limfocite și dacă ar putea fi cultivată *in vitro*, clonul care rezultă de aici ar produce un anticorp specific; am avea atunci de-a face cu un anticorp monoclonal. Celulele producătoare de anticorpi nu pot fi, din păcate, menținute în cultură. Totuși, celulele anumitor tumori maligne ale măduvei osoase sau mieloame produc mari cantități de imunoglobuline anormale; aceste celule pot fi cultivate la nesfîrșit (cloni) și imunoglobulinele pe care le produc ele au o structură identică; sînt, de fapt, anticorpi monoclonali, dar nu se știe cărui antigen îi corespund. De remarcat faptul că aceste imunoglobuline, produse în mari cantități de unii bolnavi atinși de mielom (pînă la 10 grame per litru de sînge), au prilejuit elucidarea structurii chimice complete a anticorpilor de către Edelman și Porter (premiul Nobel în 1972).

Milstein, care a condus o unitate de biologie moleculară la Institutul Național de Microbiologie din Argentina, a revenit să lucreze, începînd din 1961, la Cambridge, Marea Britanie (Laboratory of Molecular Biology, Medical Research Council), și s-a ocupat de cultura celulelor de mieloame. În 1973, Cotton și Milstein au fuzionat celule de mielom de șobolan și de șoarece și au constatat că imunoglobulinele produse de celulele hibride reprezentau diverse combinații ale lanțurilor polipeptidice sintetizate de liniile parentale, dar niciodată o combinație a regiunii V a unei linii cu o regiune C a alteia (v. p. 85). Experiența de hibridare realizată de Cotton și Milstein a demonstrat că genele răspunzătoare de sinteza regiunilor C și V trebuiau să fie pe același cromozom și că secvențele nucleotide ale acestor gene erau excizate și reasociate pe aceeași moleculă de ARN (eliminare de introni prin excizare și resudare a secvențelor nucleotidice corespunzătoare genelor C și V). Această experiență a demonstrat de asemenea că nu există eliminare alelică în celulele hibride, deoarece informația celor două linii parentale era exprimată în celulele fuzionate în mod „codominant" (v. pag. 86).

Köhler, care efectua cercetări în laboratorul lui Milstein, s-a ocupat de mutațiile genelor care guvernează sinteza imunglobulinelor, deoarece teza sa de doctorat făcută la Institutul de Imunologie din Bâle avea ca obiect variabilitatea anticorpilor și răspunsul imunitar. Continuarea acestor cercetări necesita, într-o situație ideală, izolarea unui clon de celule care puteau fi cultivate și puteau produce un singur anticorp împotriva unui antigen determinat. Un asemenea clon nu exista și mieloamele erau singurele sisteme capabile să sintetizeze un tip special de anticorpi. Totuși unul dintre mieloamele (MOPC 315) studiate de Potter (National Cancer Institute) la șoarece prezenta o specificitate privitoare la un antigen și Köhler a încercat să cultive celule de acest tip, dar în zadar. Acest cercetător s-a îndreptat atunci spre un alt proiect de cercetare care trebuia să consiste din a fuziona două celule de mieloame diferite de șoarece și să examineze imunoglobulinele produse de celulele hibride, după exemplul experiențelor făcute de Cotton și Milstein

în cazul fuziunii celulelor de mieloame de șoarece și de șobolan. Mieloamele alese de Köhler conțineau o altă linie celulară izolată și de Potter și numită P3; celulele acestui mielom P3 au putut fi cultivate *in vitro* și Milstein a reușit să izoleze unii dintre mutanții lor. Köhler a izolat o variantă a lui P3, care rezistă la azaguanină, apoi a supus-o fuzionării cu un alt mielom, P1, pentru a constata că hibrizii produceau imunoglobuline ale celor două celule parentale.

După ce a ajuns să stăpînească tehnica fuziunii celulelor de mieloame (pînă atunci se considerase că ele se pretează anevoie unei astfel de operații), Köhler dorea să revină la proiectul său de cercetare inițial, și anume la izolarea unui clon de celule care fabrică un anticorp împotriva unui antigen determinat. S-a gîndit atunci să realizeze fuziunea între o celulă de mielom și un limfocit, a cărui populație ar fi fost expusă anterior unui antigen special; celula hibridă rezultînd din această fuziune putea apoi să sintetizeze anticorpul corespunzător acestui antigen și, în același timp, să aibă proprietatea de a se multiplica la nesfîrșit, proprietate ce i-ar fi fost conferită de celula mielomului. Succesul unei asemenea întreprinderi părea cu atît mai incert cu cît limfocitele nu fuzionau ușor și trebuiau să fie examinate mii de celule hibride pentru a se găsi una care să aibă proprietățile cerute.

La sfîrșitul anului 1974, Köhler a reușit să obțină un hibridom prin realizarea fuziunii între o celulă de mielom P3 (care rezistă la azaguanină) și un limfocit de splină de șoarece imunizată contra unor hematii de oaie. Experiența a constat în imunizarea șoarecilor contra acestor hematii (anticorpii produși împotriva acestui antigen sînt ușor de evidențiat în ser printr-o tehnică elaborată în 1963 de Jerne și Nordin); a urmat apoi amestecarea celulelor mielomului P3 de șoarece cu celule de splină de șoarece imunizate, în prezența polietilenglicolului. Celule provenind din fuziunea celor două linii celulare parentale au fost apoi izolate pe un mediu selectiv și ele produceau anticorpi contra hematiilor. Köhler și Milstein (1975) au reușit să izoleze cloni de celule capabile să producă un tip special de anticorpi și să-i cultive în continuu. Aceste celule-himere, numite hibridomi, au păstrat proprietatea de nemurire a celulelor mielomului și pe cea de a produce anticorpi specifici ai antigenului cunoscut; rezultat al fuziunii unei celule producătoare de anticorpi cu o celulă tumorală, ele erau capabile să se multiplice la nesfîrșit în cultură și să producă, în același timp, un tip anumit de anticorpi (anticorp monoclonal).

Înainte de a publica aceste rezultate, Milstein a propus autorităților guvernamentale competente brevetarea tehnicii de producerea celulelor hibridomilor; în absența răspunsului, Köhler și Milstein au publicat comunicarea lor în revista *Nature*, din 14 mai 1975, iar guvernul britanic a pierdut astfel ocazia unui brevet asupra unei invenții considerate ca una dintre cele mai importante din deceniul 1970—1980. Ea reprezenta în mare măsură rezultatul a două decenii de cercetări legate de sinteza anticorpilor, de cultura celulelor și de fuziunea acestora.

Întors la Bâle, la Institutul de Imunologie, Köhler a perfecționat tehnica de producere a hibridomilor și, în loc să se specializeze în producerea de anticorpi monoclonali, s-a dedicat din nou studiului mutațiilor celulelor producătoare de imunoglobuline.

Producerea de anticorpi monoclonali

După ce au remediat un anumit număr de dificultăți de manipulare, Milstein, Howard și Butcher (Agricultural Research Council Institute of Animal Physiology, la Cambridge) urmau să obțină fuziunea celulelor care produceau anticorpi monoclonali privind antigenii de histocompatibilitate ai șobolanului, și anume cei care sînt răspunzători de specificitatea individuală și de respingerea grefelor.

Cînd un clon se obține pornind de la celule ce rezultă din fuziunea celor două linii celulare, anticorpul pe care îl produce acest clon nu este neapărat un anticorp monoclonal în sensul imunologic al termenului, deoarece în fiecare celulă a clonului hibrid se află cromozomi din fiecare din cele două linii celulare parentale și expresia acestora duce la producerea imunoglobulinelor din celulele de splină (lanțuri grele și ușoare) și din celulele mielomului (lanțuri gamma și kappa). Dar celulele hibride pierd repede cromozomii în cursul primelor stadii ale multiplicării lor; această pierdere nu se face la întîmplare, și Köhler și Milstein căutau să izoleze clonii care pierduseră cromozomii corespunzători celulei mielomului și care nu-i exprimau decît pe cei ai celulei de splină imunizată, adică cei care nu sintetizau decît lanțurile grele și ușoare ale imunoglobulinelor (HL) ce reacționează cu hematiile de oaie. O astfel de operație de selecție putea fi simplificată prin alegerea unei linii mutante de celule ale mielomului care nu producea imunoglobulină, deoarece în aceste condiții fuziunea celulară avea ca rezultat un hibrid HL.

Clonii selecționați pot fi conservați prin congelare. În orice clipă, un eșantion din unul dintre acești cloni poate fi injectat unor animale din aceeași linie cu cea care a furnizat celulele pentru fuziune. Se dezvoltă astfel tumori la aceste animale și ele produc anticorpul monoclonal corespunzător clonului; acest anticorp se află în serul animalelor în concentrații ridicate, cuprinse între 10 și 30 mg/ml. Eșantionul clonului respectiv poate fi și el cultivat *in vitro* și anticorpul pe care îl produce este recuperat din mediul de cultură.

Milstein și colaboratorii săi au obținut anticorpi monoclonali privind antigenii de mici dimensiuni sau haptene, care reacționează cu proteinele (inclusiv enzime), glucidele și glucolipidele, virusurile și substanțele constitutive ale membranei celulare. Tehnica hibridomilor este în general aplicabilă și anticorpul monoclonal poate fi definit ca un reactiv chimic cu structură determinată, a cărui producere se realizează după voie, în timp ce antiserul preparat prin tehnicile obișnuite este un amestec de reactivi de compoziție variabilă, care nu mai poate fi reprodus o dată epuizată sursa inițială. Anticorpul monoclonal era purificat prin trecerea pe coloane cromatografice care conțin antigenul cunoscut și, în 6—12 luni, puteau fi obținute cantități nelimitate din același anticorp, cu un grad de puritate și de omogenitate necunoscut pînă atunci. În timp ce era nevoie de 1 200 de litri de ser uman, provenind din 6 000 de donări de sînge, pentru obținerea anticorpilor slujind la identificarea grupelor sanguine A, B, 0, Milstein și colaboratorii săi au izolat din culturi de hibridomi un reactiv specific al antigenului grupei sanguine A, care s-a dovedit la fel de eficient ca și cei mai buni reactivi disponibili în comerț.

Aplicații ale anticorpilor monoclonali

Cum hibridomii pot fi conservați prin congelare, au fost constituite hibridoteci în unele institute și laboratoare pentru a satisface nevoile de cercetare. Anticorpii monoclonali, care în 1981 erau disponibili sub formă de eșantioane, valorau între 200 și 400 dolari miligramul, dar producerea lor pe scară largă interesa în cel mai înalt grad numeroase firme farmaceutice, deoarece aria de aplicare a acestor anticorpi cuprinde atît dozajul diverselor substanțe cît și diagnosticele de diferite feluri (identificarea unui hormon, a unui antigen viral sau bacterian, sau a grupurilor sanguine și tisulare).

Dozajul unui medicament poate fi de asemenea estimat datorită unor anticorpi monoclonali ai unui animal imunizat contra acestui medicament. Fiabilitatea acestui imunodozaj și economia pe care o atrage constituie avantaje foarte mari. În mai 1981, Food and Drug Administration autoriza pentru prima oară comercializarea pe piața americană a unei truse de diagnostic al cărui principiu se baza pe producerea de hibridomi și care era destinat să depisteze alergiile. Aplicații similare puteau fi realizate pentru efectuarea testelor hormonale, pentru diagnosticarea bolilor virale, depistarea anumitor cancere și supravegherea prezenței sau apariției de celule maligne după un tratament chirurgical sau de radioterapie. Farrands și colaboratorii săi (Universitatea din Nottingham, Marea Britanie) au reușit să izoleze un anticorp care reacționează în mod specific la tumori maligne ale colonului și rectului. Marcat de iodul radioactiv, acest anticorp monoclonal a fost injectat unor bolnavi la care era cunoscut diagnosticul clinic al acestor tumori. Pe radiografiile care au fost luate cu ajutorul unui aparat cu raze gamma, apoi analizate cu ajutorul unui ordinator, extinderea exactă a tumorii inițiale și a eventualelor ei metastaze în organism au putut fi reperate cu o precizie rară. Pentru prima oară tumorile inițiale și metastazele lor erau astfel localizate în mod specific. Rezultatele cercetătorilor britanici, publicate în 1982, veneau în urma unor lucrări remarcabile, deși mai puțin specifice, ale lui Mach, la Lausanne, care au utilizat aceeași tehnică pentru a detecta unele cancere ale tiroidei sau tubului digestiv, ale lui Tubiana (Institutul Gustave-Roussy, Franța) și ale unor cercetători de la Imperial Cancer Research Fund, din Londra, care au reperat, în același mod, cancere epiteliale.

Purificarea amestecurilor complexe de substanțe cu rol biologic important (proteine, hormoni, toxine) putea fi de asemenea efectuată cu ajutorul anticorpilor monoclonali. În cazul interferonului, Secher și Burke (Universitatea din Warwick, Marea Britanie) au obținut, prin tehnica imunoabsorbției, preparate a căror puritate era de ordinul a 1%. După ce au imunizat șoareci cu interferon astfel purificat, ei au fuzionat celule de splină ale acestor șoareci cu celule de mielom de șoarece; ei au selecționat apoi un clon, ale cărui celule, injectate unor șoareci, produceau mari cantități dintr-un anticorp legat de interferon. Acest anticorp a fost legat de niște sfere de glucide pentru a prepara o coloană de absorbție, care servea la purificarea preparatului de interferon brut; gardul de puritate al acesteia era de 5 000 de ori mai mare după o singură trecere prin coloana conținînd anticorpul monoclonal (Milstein, 1980).

S-a proiectat de asemenea folosirea acestor anticorpi pentru marcajul și identificarea exactă a celulelor specializate, ca neuronii, pentru o mai bună

cunoaștere a modalităților de asociere și de funcționare a acestor celule (localizarea mediatorilor chimici).

Tehnica anticorpilor monoclonali prezintă și un interes deosebit în domeniul structurii membranelor celulare. Proteinele acestor membrane sînt într-adevăr greu de purificat, sînt prezente în cantități mici, iar activitatea lor biologică nu este ușor de măsurat sau chiar încetează cînd membranele sînt solubilizate în cursul protocoalelor experimentale de analiză. Este posibil ca aceste dificultăți să fie depășite prin caracterizarea cu ajutorul metodelor imunologice a proteinelor membranelor, ca în cazul suprafețelor celulare care caracterizează diferitele stadii ale diferențierii țesuturilor. Dar anticorpii preparați prin tehnicile obișnuite în ceea ce privește antigenii de suprafață sînt în general complecși și nu recunosc molecule individualizate.

În 1977, Milstein, Galfré și Williams (în Milstein, 1980) au imunizat un șoarece cu membrane de celule din timusul de șobolan. După ce au preparat celule de tip hibridoma care produceau anticorpi ai limfocitelor timusului, acești cercetători au reușit să izoleze cloni care sintetizau mai mulți anticorpi specifici de antigeni de suprafață. Anticorpii monoclonali puteau fi folosiți ca reactivi normalizați pentru identificarea moleculelor care se află în membranele celulare și apoi pentru distingerea populațiilor de celule. Rezultate promițătoare au fost obținute în cazul mai multor celule sanguine și limfoide, în timp ce una din aplicațiile acestei tehnici era diagnosticul diferențial al diverselor leucemii și al dezordinilor patologice corespunzătoare.

În domeniul terapeutic, seroterapia poate deveni și mai eficientă prin administrarea unui anticorp purificat sau monoclonal. Anticorpii monoclonali ar putea de asemenea să servească la fabricarea vaccinurilor foarte specifice, în special împotriva unor anumite tulpini virale și a paraziților.

În 1980, Croce și colaboratorii săi (Wistar Institute of Anatomy and Biology, din Philadelphia) au obținut celule hibridoma umane prin fuzionarea de limfocite B de la un bolnav atins de mielom multiplu cu limfocite provenind de la un alt bolnav suferind de panencefalită subacută.

Celulele acestui hibridom produceau molecule de imunoglobulină M umană specifice unor anumiți constituenți ai virusului rujeolei. Un asemenea rezultat lăsa să se întrevadă posibilitatea obținerii unor hibridomi de limfocite B de origine umană, capabile să producă anticorpi împotriva virusurilor patogene.

În cazul schistozomiazei (bilhariozei), dubla membrană a viermelui parazit, schistozomul, conține vreo zece proteine a căror greutate moleculară este cuprinsă între 18 000 și 200 000 și care sînt răspunzătoare de proprietățile antigenice ale parazitului. Taylor (Cambridge) și Dissous (Institut Pasteur din Lille, Franța) au preparat anticorpi monoclinali contra acestor antigeni polipeptidici avînd greutățile moleculare de 24 000 și respectiv de 37 000 (Simpson și Cioli, 1982). Pe de altă parte, cînd parazitul devine adult, el își pierde proprietatea de a capta anticorpii pe care gazda îi produce împotriva lui, deci el devine capabil să evite reacțiile de apărare ale gazdei. S-ar părea că schistozomul este în măsură să sintetizeze molecule asemănătoare cu cele ale gazdei, deoarece s-au găsit la nivelul membranelor periferice ale schistozomului de șoarece constituenți ai complexului de histocompatibilitate. Simpson (National Institutes of Health) a reușit să pună în evidență, utilizînd anticorpi monoclonali, un antigen H-2 pe membrana schistozomului (Simpson și Cioli, 1982). Analiza genomului parazitului a demonstrat că genele răspunzătoare de sinteza

antigenilor de histocompatibilitate ai omului sau ai șoarecelui nu erau prezente la parazit, care trebuia să dobîndească aceste molecule de la gazdă. Rolul lipoproteinelor din membrane ar fi foarte important în această privință, studiul lor detaliat, mai ales datorită utilizării anticorpilor monoclonali este o condiție indispensabilă pentru prepararea de vaccinuri sau pentru o chimioterapie eficace.

Anticorpii monoclonali ar putea de asemenea să neutralizeze acțiunea limfocitelor răspunzătoare de respingerea grefelor și să distrugă autoanticorpii produși în bolile autoimune (unele diabete, scleroza în plăci, boli reumatismale). Asociați cu substanțe medicamentoase ei ar putea să facă să crească în mod considerabil eficacitatea acestora asupra celulelor-țintă, de exemplu asupra celulelor maligne, evitînd efectele secundare grave ale tratamentelor anticanceroase. Leserman, Barbet și Machy (1981) de la Centrul de Imunologie INSERM-CNRS, din Marseille - Luminy au reușit să fixeze anticorpi monoclonali la suprafața lipozomilor, vezicule lipidice, capabile să traverseze membranele celulare și să transporte milioane de molecule medicamentoase către ficat, unde ele își depun conținutul, sau către celulele speciale corespunzînd anticorpilor cărora le-au fost asociate. Substanțe medicamentoase, compuși anticanceroși, hormoni, toate ar putea fi astfel îndreptate către interiorul celulelor pe care dorim să le vindecăm sau să le distrugem.

Anticorpii monoclonali și acțiunea antitumorală

Începînd din 1979 în mai multe laboratoare americane au fost preparați anticorpi monoclonali care reacționează cu antigenii cancerelor de plămîn, sîn, pancreas, melanoame, limfoame și de leucemie.

Minna, Cuttita și Rosen (National Cancer Institute) au examinat 15 000—20 000 de anticorpi monoclonali în scopul de a-l izola pe cel care ar fi specific cancerului cu celule pulmonare mici, a cărui incidență în S.U.A. a fost estimată la un sfert din 130 000 de cazuri anuale de cancer pulmonar. Prepararea acestor anticorpi monoclonali de către cercetătorii de la National Cancer Institute cuprindea în primul rînd izolarea limfocitelor de splină de șoarece imunizate împotriva celulelor canceroase, apoi fuziunea lor cu celule de mielom de șoarece și, în sfîrșit, obținerea clonilor pornind de la celule hibride. Anticorpii produși de aproape 20 000 de cloni astfel izolați au fost testate asupra a două linii celulare canceroase și cu o linie de celule limfoide necanceroase. Optzeci de anticorpi au reacționat cu celulele canceroase, și nu cu celulele normale. Trei dintre acești 80 de anticorpi au fost supuși unor teste mai extinse și unul dintre ei a reacționat cu celule renale normale și cu celule tumorale (cancere la plămîni și la sîn, neuroblastom) (Marx, 1982). La rîndul lor, Steplewski, Koprovski ș.a. (Wistar Institute of Anatomy and Biology, din Philadelphia) au preparat anticorpi monoclonali împotriva unei linii de celule colorectale, și care trebuiau să fie utili în detectarea cancerelor tubului digestiv. Ginsburg și Magnani (National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases) au reușit să identifice antigenul celulelor colorectale care reacționa cu anticorpii la o moleculă mare glucolipidică (monosialogangliozida). Această glucolipidă nu se afla în celulele adulte normale, dar era prezentă în celulele fetale. Cercetătorii de la Wistar Institute au putut așadar să deceleze acest antigen în sîngele a

23 de bolnavi din 33, care erau atinși de cancere avansate de colon și rect; antigenul lipsea din sîngele a 38 de voluntari sănătoși. De asemenea, ei au reperat acest antigen în sîngele bolnavilor suferind de cancer al stomacului și al pancreasului (Marx, 1982). Cît despre Metzgaz și colaboratorii săi (Duke University Medical Center), ei au preparat o serie de cinci anticorpi monoclonali contra unor celule tumorale din pancreas și au caracterizat antigenii tumorali cu care aceștia reacționau. Unul dintre acești antigeni era prezent în serul bolnavilor atinși de cancer al pancreasului și concentrația sa era în funcție de starea de gravitate și de avansare a bolii; deoarece diagnosticul cancerului de pancreas este făcut adesea prea tîrziu pentru a mai începe o terapeutică, diagnosticarea sa cu ajutorul anticorpilor monoclonali ai antigenului în serul bolnavilor ar putea fi un mijloc de descoperire precoce a sa (Marx, 1982).

Harris și colaboratorii săi (Universitatea Oxford) au reușit să identifice și să producă un anticorp *Cal* capabil să detecteze un antigen *Cal* care se afla pe membranele celulelor unui mare număr de tumori maligne umane (cancere ale sînului, uterului, ovarului, rinichiului, laringelui, plămînului, stomacului, intestinului și ficatului, ale țesuturilor conjunctive și osoase), dar nu în cele ale tumorilor benigne ale acelorași organe sau țesuturi (negi, chisturi, adenoame), și nici în membranele celulelor normale (antigenul *Cal* a fost totuși localizat în căptușeala trompelor lui Fallope și în epiteliul tranzitoriu al căilor urinare). Detectarea primului marker molecular al cancerului, *Cal*, printr-un procedeu imunohistochimic simplu și specific care consta în unirea acestui antigen cu anticorpul monoclonal *Cal* produs în acest scop, constituia un mijloc de diagnostic sigur atît asupra secțiunilor tisulare realizate pornind de la biopsii cît și în secrețiile care conțin celule maligne izolate (frotiuri vaginale, prelevări gastrice sau bronhice, de exemplu). Wellcome Foundation urma să comercializeze anticorpul *Cal*, a cărui contribuție la diagnosticarea exactă și cît mai timpurie a cancerelor va fi prețioasă. Aceste caracteristici ale diagnosticului condiționează într-adevăr în mare măsură șansele de vindecare. În plus, anticorpul *Cal* va putea să joace și un rol important în terapeutica anticanceroasă, care, spre deosebire de radioterapie și chimioterapie, tinde, din ce în ce mai mult, să antreneze molecule antagoniste. Această cancerologie moleculară marchează, după părerea specialiștilor, sosirea unei ere noi în detectarea precisă și tratamentul cancerelor, la care contribuie multe discipline (biochimie, genetică, imunologie, virusologie, histologie, epidemiologie, farmacologie).

Folosirea imunoglobulinelor radioactive în terapeutica anticanceroasă a fost descoperită de Order (Secția de Tratamente ale Tumorilor prin Iradiere, Johns Hopkins University Medical School, Baltimore) și această tehnică a fost studiată începînd din 1979/80 pe persoane atinse de cancere primare de ficat, inoperabil. Această terapie părea mai eficace decît chimioterapia sau radioterapia obișnuită (Marx, 1982). La Johns Hopkins Oncology Center a fost testată, începînd din 1982, eficacitatea tratării unor tumori solide cu ajutorul anticorpilor monoclonali radioactivi, în colaborare cu Hybritech Corporation (San Diego, California) și în asociație cu Universitatea din California (San Francisco) și cu Albert Einstein Medical Center (Philadelphia).

În martie 1982, Miller ș.a. (Stanford University Medical School) au făcut cunoscută, cu prudența obișnuită în acest domeniu, prima remisiune de lungă durată (zece luni), observată la un bolnav atins de limfom și tratat

cu ajutorul unor anticorpi monoclonali de șoarece, care recunoșteau în mod specific regiunea variabilă (idiotipul) anticorpului monoclonal prezent la suprafața celulelor tumorale (limfocite B). Tratamente asemănătoare ale altor tipuri de limfoame (limfocite T tumorale) nu au dat, într-adevăr, decît rezultate mediocre. Chiar dacă rezultatele obținute de Miller ș.a. au fost confirmate, trebuie observat faptul că era vorba de un caz foarte deosebit, deoarece celulele tumorale ale limfoamelor B sintetizează imunoglobuline de suprafață nesecretate în sîngele bolnavului. Tocmai împotriva acestor imunoglobuline de suprafață, izolate și purificate, au fost fabricați prin tehnica hibridomilor anticorpi monoclonali antitumorali. Cînd este vorba de tumori ale sistemului limfatic ce produc anticorpi care circulă în sîngele bolnavului, anticorpii monoclonali antitumorali preparați sînt neutralizați de imunoglobulinele anormale care se află în sînge înainte chiar de a atinge celulele tumorale; vindecarea sau remisiunea devine astfel problematică.

În momentul descoperirii lui, un focar canceros cuprinde aproape un miliard de celule, ceea ce echivalează cu o celulă canceroasă la 100 000 de celule sănătoase ale organismului. Tratamentele anticanceroase constau în distrugerea acestor celule fără să lezeze celulele intacte care le înconjoară; proprietatea esențială a agentului antitumoral este deci selectivitatea sa. Totuși medicamentele anticanceroase distrug mai ales celulele care se divid cu repeziciune, ceea ce le face ineficace în privința tumorilor cu dezvoltare lentă. Anticorpii monoclonali ar putea fi asociați unor substanțe citotoxice în lupta împotriva cancerului.

Din 1958, Mathé (Institutul Gustave-Roussy, din Villejuif, Franța) a propus această metodă și a făcut primele teste, care constau în anticorpi cuplați cu agenți antineoplazici (metotrexat, clorambucil, daunomicina), îndreptați împotriva celulelor tumorale, dar acești agenți nu aveau o toxicitate suficientă și anticorpii erau impuri. Toxinele de origine vegetală sau microbiană erau mai puternice: toxina difterică, ricina din semințele de ricin, α-amanitina din amanitele veninoase. Krolick, Uhr și Vitetta (University of Texas Southwestern Medical School, din Dallas) au demonstrat că un preparat compus dintr-un lanț de ricină și un anticorp policlonal putea să distrugă aproape toate celulele tumorale ale măduvei osoase la șoareci leucemici, fără să distrugă celulelele-mamă ale hematiilor și leucocitelor (Marx, 1982). Dar, în general, aceste toxine distrugeau celulele canceroase *in vitro* precum și celulele sănătoase, deoarece ele aveau proprietatea de a se fixa pe suprafața oricărei celule. Era nevoie, așadar, de molecule în stare să se fixeze în mod electiv. Ricina era potrivită pentru o asemenea operație, ea fiind formată din două lanțuri polipeptidice diferite: lanțul A care conține grupările toxice și lanțul B care conține situl de recunoaștere a galactozei și permite ricinei să se fixeze pe membrana celulară. La centrul de cercetări Clin-Midy, din Montpellier, în 1975, au fost efectuate lucrări de purificare a lanțului A, pentru a-l cupla cu anticorpi care recunosc celulele canceroase; astfel ricina, care nu mai avea lanțul B, nu se putea fixa decît pe celulele acestea și nu pe altele (Casellas și Gros, 1982). Din 1978, mai multe echipe de cercetători au reușit să prepare astfel de molecule hibride sau imunotoxine [1] alcătuite din lanțul A al ricinei

[1]) Aceste „himere proteice" sînt denumite proteine retiariene (lat. retiarius, retiar, care desemna în Roma antică pe gladiatorul înarmat cu o plasă pentru a-l prinde pe adversar — echivalentă a anticorpului — și cu un trident pentru a-l ucide — echivalent al citotoxinei).

(care există din abundență în semințele de ricin și este produsă în cantități de zeci de grame) și anticorpi monoclonali, și să-i utilizeze cu titlu experimental. Aceste imunotoxine au recunoscut antigenii prezenți în anumite tumori de șoarece sau asociați cu neoplasme umane. După cum considerau Casellas și Gros, era nevoie de 1 000 — 100 000 de ori mai mult reactiv pentru a distruge o celulă sănătoasă decît una canceroasă; selectivitatea era deci crescută și toate celulele neoplazice erau la fel de sensibile la toxina *in vitro*. Imunotoxinele se dovedeau capabile să oprească dezvoltarea tumorilor la animale.

Imunotoxinele, care au dat rezultate deosebit de promițătoare, constituie un exemplu cît se poate de semnificativ al unui medicament conceptualizat într-un scop foarte clar înainte de a fi fabricat. Înainte de a trece la aplicații clinice, vor fi de trecut unele obstacole: eventuala inactivare a toxinei de către anticorpii bolnavului, posibila neutralizare a toxinei de către antigenii tumorali care circulă în sînge, ineficacitatea împotriva tumorilor de mari dimensiuni sau a neoplasmelor invadante etc.

Acestor aplicații terapeutice ale anticorpilor monoclonali ar putea să li se reducă eficacitatea ca urmare a prezenței antigenilor tumorali care se găsesc în sîngele unor bolnavi și care se fixează pe anticorpi, împiedicîndu-i să acționeze asupra celulelor tumorale. Pe de altă parte se întîmplă ca după unirea cîtorva anticorpi cu celulele, antigenul țintă să dispară de pe suprafața celulară, făcînd astfel inoperanți anticorpii monoclonali. O astfel de modulație antigenică, observată în timpul cercetărilor făcute asupra bolnavilor de leucemie, ar putea reduce eficacitatea administrării repetate a anticorpilor.

O altă problemă legată de utilizarea anticorpilor monoclonali în lupta împotriva cancerului și în general din domeniul terapeutic este legată de lipsa de disponibilitate a anticorpilor de origine umană. Toate experiențele au fost făcute cu anticorpi de șoarece sau cu anticorpi policlonali provenind de la mai multe animale diferite. Or, există teama ca la bolnavi să nu apară reacții anafilactice grave cu urmare a administrării repetate de anticorpi străini. Prepararea anticorpilor monoclonali de origine umană constituie o prioritate a cercetării în acest domeniu și una dintre dificultăți o constituie, în această privință, absența unei linii celulare de mielom uman ușor de cultivat și care nu produce anticorpi proprii. Conducerea lui National Cancer Institute din S.U.A. proiecta, pentru 1982, să aloce pentru aceste cercetări aproape 500 000 dolari. Ar trebui, de asemenea, să fie izolate celule umane care produc anticorpi împotriva antigenilor tumorali: protocolul experimental pus la punct în cazul șoarecilor (injectarea de celule tumorale, apoi izolarea celulelor de splină imunizate împotriva antigenilor tumorali) nu se poate realiza la om.

Cu toate acestea, Schlom și Wunderlich (National Cancer Institute) au reușit să fuzioneze limfocite de ganglioni limfatici (prelevate în timpul unei intervenții chirurgicale în cazul unui cancer al sînului) cu celule de mielom de șoarece. Hibridomii produceau anticorpi împotriva antigenului de cancer al sînului; dar acești hibridomi erau instabili, pierdeau cromozomii umani și nu mai sintetizau anticorpi umani. Unele linii ar putea rămîne stabile și ar reprezenta o soluție la problema producerii de anticorpi monoclonali de origine umană (Marx, 1982).

Heterogenitatea antigenilor tumorali, adică existența antigenilor diferiți în tumorile aceluiași cancer sau la suprafața celulelor aceleiași tumori, este

un alt factor care face obligatorie utilizarea de amestecuri de anticorpi monoclonali în lupta împotriva unui cancer determinat.

Hibridomii și anticorpii monoclonali pe care îi produc vor putea astfel să participe la revoluția terapeutică ce se va bizui pe progresele biochimiei moleculare și ale imunologiei, și care va apela din ce în ce mai mult la substanțe biologice și la acțiunea asupra mecanismelor fiziologice pentru a lupta împotriva diferitelor stări patologice.

Fabricarea anticorpilor monoclonali

Un număr de peste 20 de societăți europene și nord-americane s-au interesat de aplicațiile anticorpilor monoclonali. În California, de exemplu, anumite companii prepară truse de diagnosticare a hepatitelor sau alergiilor, altele prepară reactivi destinați industriei medicamentelor, iar altele produc dispozitive care fac posibilă reperarea celulelor maligne. La Philadelphia o firmă s-a specializat în diagnosticul maladiilor canceroase, cardiace, hepatice și virale, după ce a obținut două brevete pentru fabricarea de anticorpi monoclonali împotriva celulelor canceroase și a antigenilor virali. Cele două brevete obținute de Koprowski ș.a. (Wistar Institute of Anatomy and Biology, din Philadelphia, și Societatea Centocore) acoperă o mare parte a aplicațiilor tehnicii hibridomilor și ele reprezintă rezultatul studiilor efectuate asupra sușelor celulare cedate acestor cercetători de către Milstein.

Conform mediilor financiare americane, piața truselor de diagnostic cu anticorpi monoclonali va reprezenta 500 000 000 de dolari în 1987 și cea a testelor de detectare a celulelor canceroase va depăși 2 miliarde de dolari în 1990. Aceste procedee noi de diagnostic sînt chemate să reprezinte o proporție în creștere a reactivilor de analiză biologică, a căror piață mondială a fost în 1980 de peste 2 miliarde de dolari (din care două treimi erau deținute de S.U.A. și Japonia). În același timp s-au lansat în această competiție și Franța, Olanda, R.F.G., Suedia și Elveția.

Astfel în Franța, Institutul Național al Sănătății și al Cercetării Medicale (INSERM) a consacrat, în 1981, a zecea parte din toate subvențiile de care dispunea unui program contractual destinat să dezvolte cercetările de inginerie biologică și medicală și să reducă dependența Franței, care importa 80% din reactivii biochimici, 65% din reactivii imunologici, 50% din reactivii hematologici și 15% din reactivii bacteriologici utilizați. În iulie 1981 s-a constituit societatea comercială Immunotech pentru a valorifica aplicațiile rezultate din celule de tip hibridoma și a-și lua locul printre principalii producători mondiali de reactivi imunologici. Prima societate franceză de imunotehnologie care beneficiază de asistența științifică a INSERM a luat naștere în ianuarie 1982, laboratorul său funcționînd în campusul universitar din Luminy, lîngă Marsilia, în apropiere de Centrul de Imunologie INSERM-CNRS din Luminy, care era printre cele mai importante din Franța. Immunotech are ca suport financiar organismele publice care asigură promovarea bioindustriei

ca și alți factori naționali de investiții provenind în majoritate din capitaluri publice. Firma a încheiat cu INSERM o convenție de colaborare conform căreia laboratoarele acestui institut urmau să-i ofere cu prioritate rezultatele cercetărilor lor, în schimbul unor obligații financiare. Immunotech se angaja, în plus, să consacre 10% din beneficiul său net unor fundații care se ocupau de cercetări medicale. Iată un exemplu al efortului făcut de cercetarea biomedicală franceză pentru a putea participa la uimitoarea piață biologică deschisă de descoperirea hibridomilor.

Biotehnologiile și creșterea productivității plantelor

Ameliorarea producției agricole și a situației alimentare și nutriționale depinde de resurse ca pămîntul, apa și energia, care în general sînt considerate ca limitate, în ciuda posibilităților de creștere a disponibilității lor. Această ameliorare este și funcție de resursele de origine biologică, care se pot reînnoi, și care sînt plantele cultivate, animalele domestice și microorganismele. Creșterea productivității acestora din urmă, și anume a productivității biologice, reprezintă un domeniu activ al cercetării în științele biologice. Tehnicile biotehnologice contribuie la aceasta din ce în ce mai mult (crearea și propagarea de noi varietăți cultivate de plante, de exemplu); ele privesc, de asemenea, utilizarea microorganismelor în producerea de substanțe utile, transformarea produselor alimentare, conservarea alimentelor și ameliorarea proprietăților lor nutritive (v. p. 139).

În acest domeniu vast, cercetările constau în obținerea unei producții superioare, a unei valori nutritive mai ridicate, a unei rezistențe crescute a plantelor la intemperii, agenți patogeni și dăunători, menținînd în același timp o diversitate satisfăcătoare în interiorul speciilor domestice și apărînd resursele genetice constituite de rudele lor sălbatice. Contribuția geneticii vegetale la aceste cercetări este esențială în măsura în care ea cunoaște, în metodele și conceptele ei, o evoluție rapidă, datorită descoperirilor recente din biologia moleculară și exploatării anumitor caractere specifice ale plantelor. Pe de altă parte, perfecționarea tehnicilor de cultură a celulelor și țesuturilor vegetale deschide perspective noi pentru ameliorarea speciilor și varietăților cultivate.

Ameliorarea varietăților cultivate și creșterea productivității lor

Primele cercetări asupra selecției noilor varietăți cerealiere de mare randament, mai ales în cazul grîului, au început după al doilea război mondial. Aceste varietăți de grîu și orez au fost selecționate în Mexic și respectiv în Filipine, dar noi soiuri au fost răspîndite în lume între 1960 și 1970 și contribuția lor la o sporire însemnată a randamentelor agricole urma să fie definitivă. Începînd cu mijlocul anilor '60, ca urmare a acestei înnoiri în mai multe țări din Asia și America Latină, expresia „revoluția verde" desemna

ansamblul eforturilor pentru a spori producția agricolă în țările în curs de dezvoltare, datorită acestor noi varietăți, mai ales de grîu și orez, care aveau în general tulpini scurte și rezistente, reacționau bine la îngrășăminte și rezistau la agenții patogeni cei mai obișnuiți. Cultivarea acestor plante necesita folosirea de diverși biocizi și recurgerea la irigații, pe lîngă fertilizarea și practicile agricole tradiționale. Încrucișările între aceste varietăți și populațiile rezistente locale făceau posibilă obținerea unor soiuri și mai bine adaptate și cu mai bune rezultate. Pe lîngă cercetările asupra grîului și orezului, aceste studii se referă și la specii de mei, de sorg, tritical, porumb, precum și la mai multe specii de leguminoase.

Rezultatele obținute se datorează, în ceea ce privește selecția noilor varietăți de mare randament, cercetărilor clasice de genetică vegetală și de ameliorare a plantelor. Tehnicile constau în transferarea unor ansambluri de caractere cromozomice prin intermediul încrucișărilor sexuate; deoarece majoritatea plantelor alimentare posedă mai multe seturi de cromozomi (specii tri-, tetra- sau chiar hexaploide), un evantai foarte larg de caractere se exprimă în descendența rezultată în urma acestor încrucișări și rolul selecționatorului este de a descoperi în descendență exemplarele care au caracterele căutate. Este vorba, cel mai adesea, de grupuri de caractere care nu sînt toate în mod necesar favorabile; în cazul speciilor de cereale, de exemplu, exemplarele cu frunzele erecte (caracter interesant pentru o cultură densă) pot avea, de asemenea, spicul mic și deci un număr redus de boabe. În acest caz selecționatorului îi trebuie multă răbdare și pricepere pentru a ajunge să izoleze liniile cu un ansamblu de caractere favorabile pe plan agronomic.

A doua „revoluție verde" de care se vorbește de pe la mijlocul anilor '70, deși este încă destul de departe de a fi tradusă în fapt, va fi rezultatul cercetărilor al căror obiectiv rămîne selecția și creșterea de noi plante rezistente la boli și dăunători, la secetă, capabile să crească fără aport de îngrășămînt sau împrăștiere de biocid dar care nu se mai bazează pe tehnicile de încrucișare, hibridare sau polenizare încrucișată. Aceste cercetări noi au într-adevăr tendința — cu ajutorul culturilor de celule, protoplaști și țesuturi, al tehnicilor de recombinare genetică — să creeze varietăți de cultură pornind de la mecanisme moleculare și celulare care sînt la originea diversității biologice. Pe plan metodologic, este vorba despre un drum scurtat considerabil și în același timp, de un pariu cîștigat. Recombinarea la nivelul acizilor nucleici și adaptarea acestei tehnici la lumea vegetală, are drept consecință eliminarea barierelor care se opun la încrucișarea între specii diferite. Ele oferă de asemenea posibilitatea de a spori diversitatea genetică ce s-a micșorat considerabil ca urmare a distrugerii mediului necesar speciilor sălbatice și care face ca acele cîteva specii și varietăți cultivate să fie foarte vulnerabile la agenți patogeni și la paraziți (în S.U.A., de exemplu, două soiuri de mazăre constituiau 96% din recolta totală, în timp ce șase varietăți de porumb contribuiau la 71% din producția pe 1981). Alături de bănci de conservare a semințelor, care sînt încă în număr insuficient, culturile de celule și de țesuturi și testarea a milioane de linii celulare vor constitui din ce în ce mai mult factori esențiali ai variabilității și diversității genetice.

Clonarea acizilor nucleici permite, de asemenea, identificarea virusurilor în țesuturile vegetale și eliminarea plantelor infectate. Owens, Cress și Diener, din serviciile de cercetare agronomică din Departamentul American al Agriculturii, au izolat ARN-ul unui virus al cartofului (potato spindle tuber disease

sau PSTD), au sintetizat ADN-ul copie corespondent şi au clonat acest ADN. Eradicarea acestui ribovirus este dificilă şi detectarea sa în tuberculii de cartof face posibilă eliminarea organelor infectate şi ca urmare obţinerea unor randamente bune prin utilizarea exclusivă a tuberculilor sănătoşi. ADN-ul clonat constituie mijlocul exact şi sigur de a repera virusul, deoarece el se poate hibrida cu ARN-ul viral.

Cultura de ţesuturi

Cultura ţesuturilor vegetale, tehnică ce a fost perfecţionată începînd din 1937, este capabilă să furnizeze populaţii importante, într-un timp relativ scurt şi într-un spaţiu restrîns, care se pretează la inducerea de mutanţi şi la selecţie. Ea permite de asemenea descoperirea unor linii de plante cu o capacitate mărită de asimilare a dioxidului de carbon şi deci cu o productivitate sporită.

Termenul de *clon* (gr. klôn „vlăstar") a fost propus în 1903 de Webber, de la Departamentul american al agriculturii, pentru a desemna plantele care erau înmulţite pe cale asexuată. Folosirea acestui termen s-a extins după aceea la toate modurile de reproducere asexuată; este folosit chiar în cazul multiplicării ADN-ului (clonarea genelor la bacterii). Dar folosirea strict ştiinţifică desemnează prin clon un organism care provine dintr-o celulă prin diviziuni mitotice. O asemenea definiţie nu implică, totuşi, o identitate fenotipică ori genotipică între clon şi individul care i-a dat naştere; se constată, de fapt, la anumite specii, diferenţe notabile între clon şi părintele său.

În 1949, s-a observat că meristemul apical al unei plante infectate de un virus (adică mica masă de celule nediferenţiate, cu o dimensiune mai mică decît a zecea parte dintr-un milimetru, situată la extremitatea tulpinii, care creşte în continuu şi dă naştere organelor plantei) era aproape neatins de virus. Seminţele produse de o plantă infectată erau cel mai adesea lipsite de virus. În 1952, Morel şi Martin (Institutul Naţional al Cercetării Agronomice, Franţa) au reuşit să obţină, pornind de la meristemul unei dalii bolnave, o dalie neatinsă de virus. O varietate de cartof, Frumosul-de-Fontenay, pe care infectarea cu un virus l-a făcut să dispară din cultură, a fost reprodus pornind de la un meristem sănătos prelevat de la o plantă bolnavă şi multiplicat *in vitro*.

Meristemul se multiplică pentru a da naştere unei mici plante cu cinci-şase frunze; după cîteva săptămîni, tulpina este tăiată în cinci-şase microbuţaşi care, în condiţii favorabile, se transformă în plante întregi. Realizarea acestor condiţii favorabile a necesitat mai mulţi ani de experimentare pentru fiecare specie vegetală pe care omul a dorit să o înmulţească în acest fel. Avantajele sînt însemnate: un meristem de zmeur poate astfel să producă 50 000 de descendenţi prin cultura *in vitro*, în timp ce tehnicile de butăşire clasică nu furnizează decît 50 de descendenţi pe an; culturile de meristeme de piersic-migdal, care serveşte drept port-altoi şi a cărui multiplicare este dificilă prin tehnicile clasice, permit obţinerea unui milion de plante pe an.

Un alt avantaj al culturii meristemelor *in vitro* este obţinerea de plante tinere, în special la plantele anuale. Această tehnică, din ce în ce mai utilizată, începînd din 1965, de către horticultorii şi pepinieriştii din ţările indus-

trializate, necesită o grijă deosebită în alegerea condițiilor de cultură și de mediu nutritiv, a cărui compoziție trebuie să se schimbe în timpul dezvoltării plantei; culturile trebuie să fie supravegheate zi de zi pentru a elimina plantele nepotrivite, ai căror cromozomi sînt modificați. Cercetările actuale urmăresc punerea la punct a unor metode de cultură mai eficiente și cu mai puține stresuri.

Riscul cel mai serios al acestei tehnici de înmulțire vegetativă este cel al diminuării diversității genetice; în măsura în care toți indivizii unei specii vegetale ar rezulta dintr-un meristem unic, o boală nouă ar putea avea consecințe catastrofale, deoarece acești indivizi, din punct de vedere genetic identici sau foarte asemănători, ar fi toți la fel de vulnerabili la agentul patogen sau la parazit. Așadar, este necesar ca pe măsură ce sînt perfecționate tehnicile de înmulțire rapidă a anumitor specii de plante, să fie create bănci de gene pentru conservarea patrimoniilor ereditare indispensabile menținerii diversității genetice.

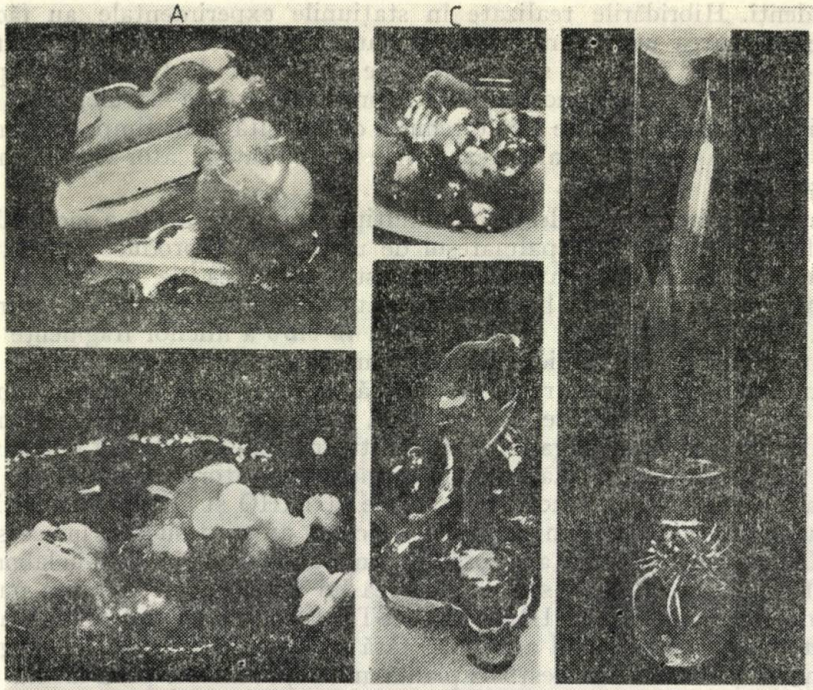
Multe specii de plante cultivate sînt înmulțite pe cale asexuată, fie pentru a păstra anumite caracteristici esențiale, fie din cauză că sînt sterile, fie din cauză că genomul lor este prea complex și reproducerea sexuată riscă să provoace mari variații fenotipice. La aceste specii apar uneori cloni diferiți ai liniilor parentale: sînt variante somatice, care provin din schimbări de natură genetică (modificarea numărului de cromozomi din nucleu, mutații la nivelul anumitor locus-uri, transformări la nivelul genelor extranucleare, în cloroplaști sau mitocondrii). Mai multe varietăți cultivate provin din variații somatice: grepfrutul roz, portocala-navel, nectarina și mai multe soiuri de cartof. La batata dulce, frecvența apariției acestor variații somatice poate atinge 2% și menținerea purității varietale prin tehnicile obișnuite de înmulțire vegetativă este problematică.

Eforturile care au fost depuse de pe la mijlocul anilor '70 pentru a obține multiplicarea vegetativă a palmierului de ulei prin tehnicile de cultură de țesuturi *in vitro* merită să fie menționate în mod deosebit, datorită consecințelor lor pe plan economic. Producția de ulei de palmier (extras din pulpa fructului, servește la fabricarea uleiurilor alimentare și a margarinelor) și de palmistă (extrasă din miezul fructului, este utilizată în fabricarea săpunurilor, detergenților și cosmeticelor) a atins, într-adevăr, în 1980—1981, 4,9 milioane de tone pe plan mondial, ceea ce aduce palmierul de ulei pe locul al doilea între plantele oleaginoase, după soia (13,4 milioane de tone) (Lioret, 1982). Plantațiile cu această specie (*Elaeis guineensis*) se întindeau, în 1980, pe mai multe milioane de hectare în zonele tropicale umede din Africa, America și Asia de Sud-Est, iar dezvoltarea acestei culturi s-a dovedit spectaculoasă între 1960 și 1980, producția mondială de ulei de palmier dublîndu-se în cursul acestei perioade. Un asemenea rezultat este consecința eforturilor de creștere și ameliorare a producției, care se lovește totuși de faptul că această plantă, care poate trăi peste 100 de ani, nu mai este rentabilă cînd arborele depășește înălțimea la care recoltarea fructelor nu se mai putea face cu ajutorul unei unelte cu coadă; așadar, durata de exploatare este de 25—30 de ani după germinație, faza de plantă tînără și fără producție fiind de cinci ani. Plantațiile trebuie deci reînnoite la fiecare 25—28 de ani, ceea ce necesită furnizarea de milioane de plăntuțe tinere. Pe de altă parte, palmierul de ulei, care are inflorescențe-mascule și inflorescențe-femele, este o specie cu fecundație încrucișată obligatorie; rezultă de aici o mare variabilitate a producției

la descendenți. Hibridările realizate în stațiunile experimentale au făcut posibilă selecționarea unor varietăți cu randamente de ulei superioare. Astfel, în Coasta-de-Fildeș, plantele selecționate de Institutul de Cercetări asupra Uleiurilor și Plantelor Oleaginoase (IRHO) produceau peste 4 t ulei la ha pe an. Ameliorarea prin hibridare este o tehnică ce necesită mult timp, de vreme ce durata necesară pentru a evalua rezultatele în mod satisfăcător se estimează a fi de zece ani.

Cercetările s-au orientat deci către multiplicarea vegetativă a indivizilor cu o producție ridicată. Dar palmaresul de ulei nu se reproduce vegetativ, frunzele nu butășesc în mod natural, și nu este posibil ca de pe tulpină să fie prelevate ramuri care să fie butășite. Cercetătorii nu aveau decît să recurgă la cultura de țesuturi *in vitro*. Nici butășirea *in vitro* a micilor fragmente de tulpină cu muguri pe ele, și nici cultura de meristeme nu au fost posibile în cazul palmierului de ulei. A trebuit atunci să se recurgă la obținerea unor mase de țesuturi neorganizate sau calusuri, în urma unei „dediferențieri" a țesuturilor unor anumite organe, apoi a cultivării acestor calusuri pînă cînd ajungeau să regenereze o plăntuță întreagă. Cercetătorii britanici de la Societatea Univeler și cercetătorii francezi de la IRHO și ORSTOM (Oficiul de Cercetare Științifică și Tehnică de peste Ocean) au avut succese în această direcție (Lioret, 1982). Studiie acestora din urmă au început în 1970 în laboratoarele ORSTOM din Bondy, sub conducerea lui Rabechault. Tehnica pusă la punct de cercetătorii de la IRHO și ORSTOM consta în prelevarea frunzelor foarte tinere de pe vîrful arborelui, fără să fie rănit meristemul mugurelui terminal (deoarece în acest caz planta moare). Într-un prim mediu de cultură, se formau, după 90 de zile, calusuri pornind de la fragmente de frunze; la trecerea pe un al doilea, apoi pe un al treilea mediu de cultură, calusurile se transformau în „embrioizi", care erau comparabili cu embrioni rezultați din reproducerea sexuată (acest proces de embriogeneză somatică a fost observat pentru prima oară la țesuturi de morcov cultivate *in vitro*, apoi la cele de alte specii vegetale). Embrionii se automultiplicau în mod spontan și această multiplicare era favorizată într-un al patrulea mediu de cultură; numărul acestor embrioni putea să se tripleze într-o lună, astfel încît din a zecea parte din ei se obțineau peste 500 000 într-un an. Un al cincilea mediu de cultură făcea posibilă dezvoltarea embrionilor în plăntuțe tinere cu frunze, iar al șaselea și al șaptelea mediu favorizau creșterea rădăcinilor. Erau necesare trei luni pentru trecerea de la stadiul de „embrioid" la cel al unei plantule a cărei parte aeriană avea înălțimea de vreo doisprezece centimetri. Acestor plantule li se ofereau după aceea, ca răsadurilor, condiții de lumină și umiditate favorabile și ele erau protejate prin tratamente fitosanitare. Apoi trebuia verificat, după înflorire și rodire, dacă plantele obținute erau corespunzătoare, mai ales pe planul producției de ulei, exmplarului care servise ca punct de plecare.

Producerea de plantule, pe baza acestei tehnici de clonare, a fost realizată, de la începutul anului 1981, pe scară semiindustrială, la stațiunea de cercetări din La Mé (Coasta de Fildeș). Era vorba de producerea clonilor pornind de la arbori adulți diferiți din punct de vedere al proprietăților agronomice și fiziologice, astfel încît să se conserve la plantele rezultate din acești cloni o diversitate indispensabilă pentru a împiedica o apariție sincronă a inflorescențelor (care ar bloca reproducerea sexuată) și pentru a rezista mai bine la paraziți și la agenții patogeni. Producția inițială era de 40 de plante pe an și primele



Multiplicarea vegetativă *in vitro* a palmierului de ulei *(Elaeis guineensis)*.
Un prim mediu de cultură face posibilă formarea de calusuri (mase de celule nediferențiate) pornind de la fragemente de frunze tinere de palmier de ulei (*A*). Aceste calusuri se înmulțesc pe un al doilea mediu și dau, pe un al treilea mediu de cultură, embrioizi care seamănă embrionilor rezultați din reproducerea sexuată (*B*). O dată realizată această embriogeneză somatică, embrionii se înmulțesc pentru a da mase de embrioni alăturați (*C*). Ei dau naștere apoi unor muguri pe un al cincilea mediu de cultură (*D*). Tinerele plăntuțe sînt plasate într-un al șaselea mediu care determină formarea de rădăcini, în timp ce al șaptelea mediu face posibilă obținerea plantulelor complete (*E*) care se pot transfera pentru creșterea lor ulterioară pe substraturi obișnuite. Este nevoie de aproape trei luni pentru a se obține o plantulă de 12 cm (partea aeriană) pornind de la un embrioid.
[Foto: Laboratorul de Fiziologie Vegetală al Serviciilor Științifice Centrale ale Oficiului de Cercetare Științifică și Tehnică de peste Ocean (ORSTOM), Bondy, France. Lucrări de cercetare efectuate în cooperare cu IRHO (stațiune de cercetări asupra palmierului de ulei din La Mé, din Costa de Fildeș). În: C. Lioret, Cercetarea (Paris), vol. 13, nr. 135, 1982, p. 927.]

plantații urmau să fie realizate în 1983 pentru a fi verificate calitățile clonilor obținuți și pentru a aprecia exact rolul jucat de influențele genotipului și ale mediului asupra acestor calități (Lioret, 1982). Alegerea acestei stațiuni din Coasta de Fildeș a fost dictată de faptul că dispunea de cea mai importantă colecție mondială de plante selecționate și era așadar posibil să fie alese plantele cele mai interesante pentru a fi reproduse pe cale vegetativă. Această stațiune urma să furnizeze, de asemenea, material clonal și altor țări din Africa Occidentală care aveau plantații de palmier de ulei. În plus, au fost încheiate

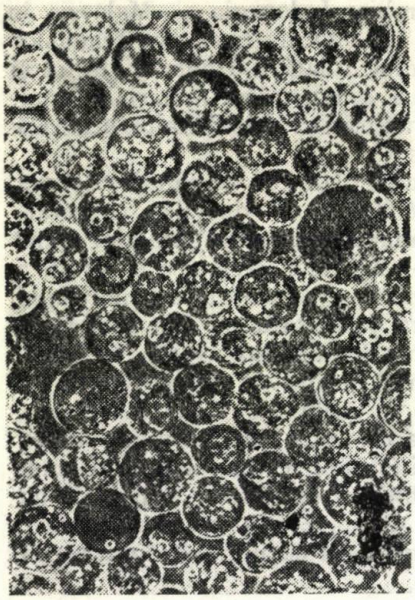
tratate de cooperare cu instituții din Columbia, Indonezia și Malaezia în vederea schimburilor de material vegetal și de informații asupra tehnicilor de clonare (Lioret, 1982). Societatea Unipamol, filială a Unilever, urma și ea să-și creeze propriile laboratoare pentru a comercializa material clonal. Milioane de plăntuțe de palmier de ulei, cu caracteristici bine definite, urmează să fie distribuite în țările tropicale interesate.

După părerea lui Lioret (1982), crearea unei plantații de palmier de ulei pornind de la răsaduri, costa în 1980/81, între 6 000 și 9 000 de dolari de hectar, costul cerealelor fiind sub 120 dolari. Prețul mai ridicat al materialului clonal nu ar majora această investiție decît cu 7—12%, dar creșterea scontată a producției (în medie 20—30% pe an) ar permite să se amortizeze mai rapid investițiile. Această creștere a producției era justificată cu atît mai mult cu cît nevoile mondiale de materie grasă erau foarte importante: în 1978, conform aprecierilor făcute de F.A.O., consumul mediu de grăsimi pe an era de 20,6 kg în țările industrializate, față de 5,5 în țările în curs de dezvoltare. Or palmierul de ulei este cultivat exclusiv în aceste țări, care exportă aproape un sfert din producție țărilor industrializate și folosesc restul pentru consumul local. O creștere netă a producției, datorită tehnicilor de clonare, ar permite nu numai să fie acoperite nevoile suplimentare datorate creșterii demografice, dar și să acopere treptat deficitul însemnat în raport cu normele unui regim alimentar echilibrat.

Cultura de celule și de protoplaste

Clonarea face apel din ce în ce mai mult la tehnicile de cultură a celulelor, deoarece o singură celulă poate să dea un întreg individ. Această omnipotență a celulelor vegetale (Steward—Universitatea Cornell — a lansat ideea aceasta în 1957) a fost stabilită în 1965, pentru cazul culturilor de țesuturi ale mai multor specii vegetale, apoi pentru celulele somatice și sexuale izolate ale unui mare număr de plante. În 1971, Takebe și colaboratorii săi au reușit să obțină protoplaste prin digerarea, cu ajutorul unei celulaze și al unei pectinaze, a pereților celulelor frunzelor de tutun. Protoplastele erau cultivate într-un mediu unde se puteau divide pentru a da naștere unor calusuri din care era posibilă regenerarea unei plante întregi. Aceste experiențe de început asupra protoplaștilor de tutun au demonstrat că peste 90% din clonii obținuți, numiți protocloni, prezentau o asemănare profundă cu liniile parentale, atît pe plan fenotipic cît și genotipic. Protoplastele de tutun făceau astfel posibilă evitarea variațiilor care caracterizau celelalate mijloace de obținere a clonilor. O asemenea stabilitate trebuie să fie confirmată și la alte cîteva specii vegetale.

În cazul cartofului, nu a fost posibil să se selecționeze, în ciuda cercetărilor active întreprinse din 1905 în Europa și America de Nord, un soi avînd, de exemplu, o rezistență multiplă la majoritatea bolilor grave, o putere de adaptare rapidă la condiții biogeografice noi și caracteristici agronomice interesante, în special un randament excelent. În S.U.A., în 1980, erau cultivate patru soiuri, pe 72% din suprafețele cultivate cu cartofi; cel mai caracteristic



Protoplaste de *Acer pseudoplatanus*.
Aceste protoplaste au fost obținute pornind de la o cultură de celule de *Acer pseudoplatanus* în fază exponențială de creștere (a 11-a zi).
[Foto: P. Steck, Institutul de Fiziologie Vegetală al Universității din Lausanne. In: Biofutur (Paris), nr. 4, 1982, p. 14.]

dintre ele era soiul Russet Burbank. În Europa, erau foarte mult cultivate soiurile selecționate către 1930, ca de exemplu, King Edward și Bintje.

Originea varietății Russet Burbank, care reprezintă aproape 40% din producția totală a S.U.A., datează din 1895, cînd botanistul Luther Burbank a selecționat o plantulă din descendența unui fruct de cartof. Această plantulă a fost după aceea reprodusă în mod asexuat, adică prin intermediul tuberculilor; astfel a fost obținut soiul Burbank. La puțin timp după începutul secolului XX, a fost selecționată o varietate somatică, căreia i-a fost dat numele de Russet Burbank din cauza nuanței roșcate a tuberculilor. Studiile lui Burbank pot fi apreciate la justa lor valoare, dacă ne gîndim că, de la începutul anilor 30, selecționatorii americani au examinat peste 20 de milioane de plante de cartof fără să reușească, totuși, să izoleze un soi atît de interesant ca Russet Burbank.

Cultivarii de cartof, care aparțin subspeciei *Solanum tuberosum ssp. tuberosum*, sînt tetraploizi ($2n = 4x = 48$). Genetica avînd ca obiect cartoful era în 1980 mai puțin avansată decît genetica tomatelor sau a porumbului, iar programele de ameliorare ale acestei specii erau de primă importanță: în S.U.A., de exemplu, 60 000 — 80 000 plante tinere erau cultivate în fiecare an (1980), în scopul identificării unui cultivar interesant. Obiectivul principal era creșterea rezistenței plantei la agenți patogeni (în jur de 22% din recolta mondială erau distruse într-adevăr de boli și diverși dăunători, și aceste pierderi erau evaluate la peste 200 de milioane de dolari pe an în S.U.A.).

În 1977, Shepard și Totten (Shepard ș.a. 1980) au elaborat tehnici de regenerare a plantelor pornind de la protoplastele celulelor frunzelor de cultivar Russet Burbank. În două săptămîni, protoplastele își sintetizau pereții celulari, se divizau și formau mici calusuri. Aceștia erau apoi cultivați în mod succesiv

Cultură *in vitro* de *Nicotiana sylvestris :* mase de celule nediferențiate sau calusuri. Aceste calusuri pot da naștere, într-un mediu de cultură de compoziție definită, unei tinere plantule.
[Foto: P. Steck, Institutul de Fiziologie Vegetală al Universității din Lausanne. În: Biofutur (Paris), nr. 4, 1982, p. 12.]

Regenerarea unei plantule de *Nicotiana longiflora* pornind de la o masă de celule provenind dintr-un protoplast din această specie.
[Foto: J. P. Bourgin, Laboratorul de Biologie Celulară, Institutul Național al Cercetării Agronomice (IRNA), Versailles, Franța. In: Biofutur (Paris), nr. 5, 1982, p. 44.]

pe trei medii pentru a da plante întregi (fig. 5). Shepard ş.a. (1980) au examinat, de asemenea, peste 10 000 de protocloni ai cultivarului Russet Burbank.

Shepard (1982) a constatat că, spre deosebire de protoclonii de tutun, cei ai cultivarului Russet Burbank nu erau identici liniei parentale, şi nici asemănători între ei. La unii dintre aceşti protocloni, numiţi varianţi fenotipici, diferenţele între indivizi erau foarte subtile şi de fapt era păstrată majoritatea caracterelor cultivarului Russet Burbank (se menţinea, în special, numărul de cromozomi de 48). Urmărind, timp de mai mulţi ani o populaţie de 65 de protocloni de Russet Burbank, cultivaţi în condiţii naturale şi nu în laborator, Shepard împreună cu alţi cercetători de la North Dakota State University au confirmat existenţa unei variaţii fenotipice la aceşti cloni la majoritatea carac-

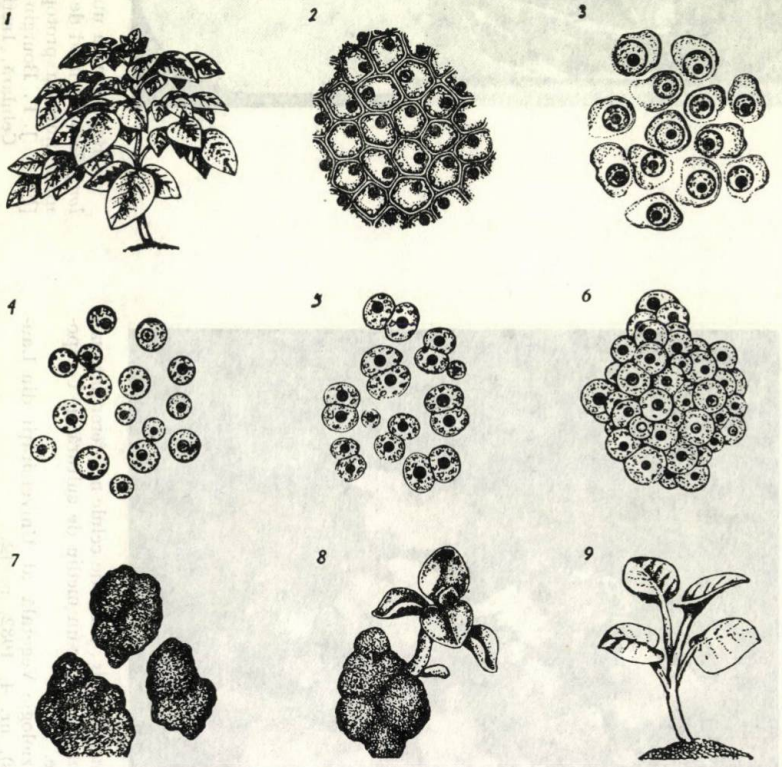


Fig. 5. Schemă ilustrînd regenerarea unei plante de cartof pornind de la protoplaste de celule foliare ale acestei specii.

Pornind de la frunzuliţe terminale ale unei tinere plante (*1*), pot fi obţinute celule foliare (*2*) care sînt apoi transformate în protoplaste, prin degradarea pereţilor celulari cu ajutorul enzimelor. Soluţia enzimatică permite, de asemenea, protoplastelor să se detaşeze de aceşti pereţi şi să păstreze o formă sferică ce protejează protoplasma în timpul degradării membranelor pecto-celulozice (*3*).

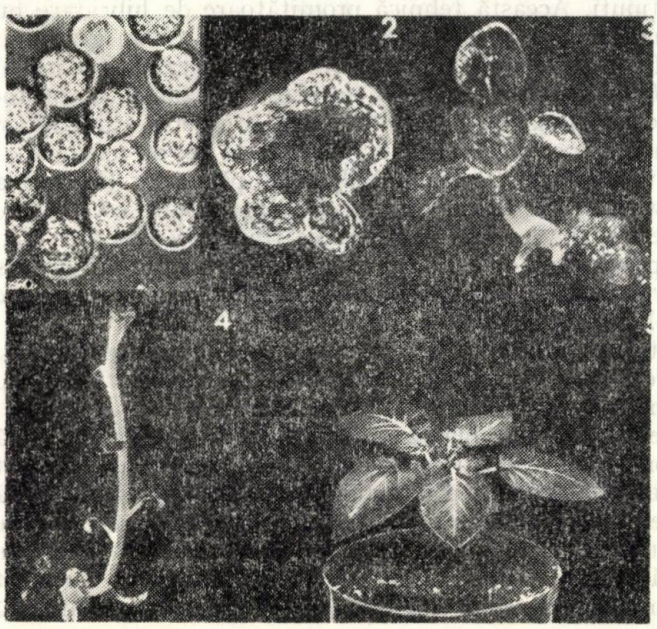
Protoplastele sînt, după aceea, cultivate pe un mediu (*4*) unde se divid (*5*) şi unde sintetizează noi pereţi celulari. După două săptămîni de cultură în aceste condiţii fiecare protoplast dă naştere unei mase de celule nediferenţiate sau microcalusuri (*6*). Aceştia din urmă se dezvoltă pe un alt mediu pentru a da calusuri (*7*), din care unele celule se diferenţiază într-un mugure (*8*) care se transformă într-o plăntuţă completă cu rădăcini pe un al treilea mediu de cultură (*9*). Plăntuţa poate fi apoi sădită.

[După J. F. Shepard, în Scientific American (New York), vol. 246, nr. 5, 1982, p. 114.]

teristicilor horticole alese; de fapt, în cazul în care toate aceste caracteristici erau considerate global, nici un protoclon din cei 65 examinați nu era asemănător cu altul și nici unul nu era copia exactă a liniei parentale de origine. În ceea ce privește randamentul de tuberculi la hectar, cercetătorii americani au constatat că protoclonii obținuți nu erau superiori din acest punct de vedere clonului parental și că, în cazul în care se manifesta această superioritate, ea varia în funcție de locul de cultură.

Cercetările lui Shepard și ale colaboratorilor săi demonstrau așadar că clonii obținuți pornind de la protoplastele celulelor de frunze de cartof (Russet Burbank) nu erau identici și că variațiile fenotipice obținute proveneau din modificări genetice în celulele somatice, a căror natură exactă era încă de domeniul ipotezelor. Această tehnică poate avea consecințe importante în domeniul agronomic, pe măsură ce va fi posibil să se selecționeze într-un mod mai eficace, în laborator, celule sau colonii de celule, care vor da naștere unor plante cu trăsături deosebit de interesante. Această operație a fost efectuată cu protoplaste de tutun, de petunia și de alte cîteva specii, căutîndu-se să se modifice caractere a căror transmitere ereditară era simplă, că de exemplu rezistența la erbicide. În privința caracterelor mai complexe, identificarea nu era la fel de ușoară și era nevoie să se facă apel la anumite trăsături fiziologice sau genetice particulare ale speciei. De exemplu, în cazul soiului de cartof Bison, ai cărui tuberculi au o epidermă de culoare roșie, protoplastele celulelor foliare își pierdeau coloratia verde în anumite condiții de cultură și acumulau antociani; expresia genei sau genelor producătoare de antociani ar putea așadar să servească drept marker genetic în experiențele de selecție, unde este necesară identificarea genomului acestui cultivar Bison.

Pare de asemenea posibil să se inducă formarea tuberculilor de cartof pornind de la calusuri care provin din protoplaste; în consecință ar putea fi așadar selecționați protocloni a căror capacitate de a forma tuberculi ar fi



Formarea unei plantule de cartof (*3*, *4*, *5*) pornind de la un calus (*2*) provenit din cultura de protoplaste (*1*).

Formarea unui mugure (*3*) este observată după șase săptămîni de cultură a calusului pe mediu special.

[Foto: J. F. Shepard, Kansas State University S.U.A.]

mai puțin sensibilă la variațiile de temperatură și la succesiunea de lumină și întuneric.

International Plant Research Institute (IPRI), din San Carlos (California), creat în 1978, Agrigenetics Corporation din Madison (Wisconsin) și Advanced Genetics Science Ltd. erau considerate drept cele mai active centre de cercetare din S.U.A., în domeniul biotehnologiilor aplicate la plante. IPRI avea un personal format din 140 de oameni dintre care 100 de cercetători, efectivele trebuiau să atingă 200 de persoane în iunie 1982. Lucrările cele mai recente aveau ca obiect selecția noilor varietăți de cartofi cu randament ridicat, varietăți de grîu în stare să crească în prezența unor concentrații mari de apă de mare în apa pentru irigații, linii de manioc lipsite de virusuri și avînd o productivitate mult superioară celei a varietăților obișnuite. Rezultatele obținute în condițiile de laborator ar putea să-și găsească treptat aplicații în condiții naturale și în acest fel s-ar lărgi cîmpul cercetărilor agronomice. Regenerarea plantelor întregi pornind de la culturi de celule sau de calusuri ar putea fi extinsă și la specii importante ca maniocul și soia, sau la unele plante cerealiere care sînt refractare unui astfel de mod de regenerare.

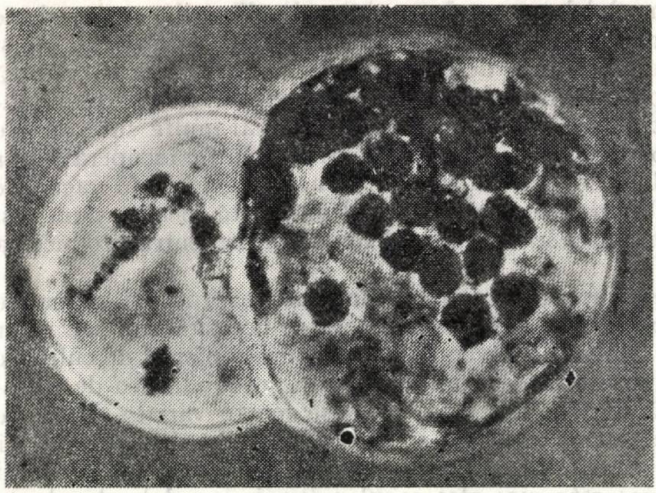
ASEAN Biotechnology Corporation (ABC) este o filială comună a lui International Plant Research Institute (IPRI) și a lui Sime Darby Berhad (Kuala Lumpur, Malaezia), care urmează să se specializeze în cercetările biotehnologice avînd ca obiect plantele cultivate din Asia de Sud-Est, îndeosebi pentru ameliorarea eficacității și randamentului fotosintezei.

Fuziunea protoplastelor; plante haploide

Fuziunea protoplastelor face posibilă lărgirea evantaiului hibrizilor vegetali care ar putea fi obținuți. Această tehnică promițătoare de hibridare nu mai merge pe calea sexuată normală, care a permis obținerea, cu un grad mai mare sau mai mic de dificultate, a unor hibrizi între grîu și secară (*Triticale*), între varză și nap (*Raphano brassica*). În 1978 s-a realizat fuziunea de protoplaste de cartof și de roșie. „Pomata" prezintă un mare interes științific, și poate și avantaje agronomice, ca prezența de tuberculi la fel de mari ca ai cartofului și fructe mai voluminoase, conținînd alcaloizii părinților (tomatina și solanina). Cartoful este o specie la care procesul de ameliorare este foarte dificil, spre deosebire de tomate, astfel că s-ar putea transfera unei varietăți de cartof prin fuziunea protoplastelor gene pentru rezistență reunite în decurs de cîteva generații la o varietate de tomate donatoare, în timp ce, cu metodele clasice de ameliorare a plantelor, ar fi nevoie de vreo 20 de ani.

Fuziunea protoplastelor de la mai multe specii de plante, aparținînd, unor genuri și familii diferite a fost realizată și cercetările au ca obiect tehnicile de a obține, după fuziune, regenerarea de organisme întregi.

La plantele diploide, rar se întîmplă ca o mutație să afecteze cele două gene (alele) de pe doi cromozomi omologi; individul este în general heterozigot (cele două gene sînt diferite), numai gena dominantă se exprimă și nu gena care se află în stare latentă. Deoarece mutațiile sînt cel mai adesea recesive (în stare latentă, ele sînt greu de pus în evidență și numai anumite tipuri de încrucișare pot să le facă să apară. Dar, la plantele haploide, care nu au decît un singur cromozom din cei doi cromozomi omologi, mutațiile se manifestă



Fuziune a două protoplaste.

Fotografia reprezintă fuziunea unui protoplast „albinos" (la stînga) provenit dintr-o celulă de frunză de cartof (varietatea Russet Burbank) și un protoplast normal (clorofilian) provenit dintr-o celulă de frunză de tomate.

Fuziunea acestor protoplaste are ca obiect introducerea în genomul cartofului a genelor de rezistență la unele boli existente în genomul tomatei.

[Foto: J. F. Shepard, Kansas State University, S.U.A. În: Scientific American (New York), vol. 246, nr. 5, 1982, p. 120.]

imediat, și în acest fel este mai ușor de urmărit expresia caracterelor și în consecință mai ușor de realizat ameliorarea speciilor vegetale. Indivizii haploizi sînt sterili, dar genomul lor poate fi dublat în mod artificial, de exemplu cu colchicină, pentru a se obține plante fertile, diploide și homozigote.

În 1964, doi cercetători indieni, Guha și Maheswari, au cultivat pe un mediu sintetic antere de laur, ale căror grăunțe de polen dădeau naștere unor embrioni, apoi unor plante haploide. Sangwan și Sangwan-Norreel (1975) au reușit să preleveze grăunțe de polen din anterele a două solanacee, *Petunia hybrida* și *Datura innoxia*, și să le cultive pentru a obține în final plante viabile; grăunțele de polen de tutun urmau să se dezvolte timp de cîteva zile în anterele lor înainte de a fi prelevate. Mediul de cultură al polenului este compus din săruri minerale, vitamine, aminoacizi, zaharuri și anumiți hormoni vegetali. Fiecare mililitru de mediu conține în jur de 10 000 de grăunțe de polen, dar numai o mică parte dintre ele pot să dea naștere, în cele mai bune condiții experimentale, unor plante androgenetice (8,6% la laur).

Cultura grăunțelor de polen a devenit sursa principală de plante haploide la speciile ornamentale, de legume, de cereale sau furajere. Grăunțele de polen ar putea oferi prilejul, mai lesne decît protoplastele, experiențelor de transformare genetică, pentru obținerea unor plante cu proprietăți deosebite.

Cultura de celule vegetale și producerea de substanțe utile

Cultura în masă a celulelor vegetale a ajuns să fie pusă la punct în 1976, cînd cercetătorii japonezi au reușit să exploateze biomasa la nivel de 20 m^3. Extracția de compuși utili pornind de la această biomasă vegetală presupune distrugerea celulelor ca în cazul microorganismelor. Dar s-au întreprins recent cercetări pentru a elimina această distrugere, deoarece o masă dată de celule vegetale este mult mai costisitor de obținut decît o masă echivalentă de bacterii

sau drojdii. Imobilizarea celulelor vegetale cu ajutorul polimerilor se dovedește a fi soluția cea mai comodă, atît pentru biosinteza unui compus util cît și pentru bioconversia unei substanțe determinate. Celulele trebuie să rămînă vii în acești polimeri o perioadă suficientă pentru ca exploatarea să fie rentabilă. Se pare că au fost obținute durate de viață de mai multe sute de zile (Hennequin, Steck și Roncucci, 1982), dar atunci trebuie să fie recuperați ușor metaboliții sintetizați, deoarece aceștia se acumulează în general în vacuolele celulelor, în loc să fie eliminați în mediul de cultură. Iată, pentru numeroși specialiști, problema esențială a utilizării celulelor vegetale pentru producerea de compuși utili.

O altă dificultate este aceea de a putea dispune de cantități suficiente de material vegetal omogen și de sușe stabile, ceea ce necesită luni sau chiar ani, în funcție de specie. Mai mult, diversitatea biochimică oferită de culturile celulare nu pare să fie inductibilă decît întîmplător și probabilitatea de a descoperi o substanță nouă impune stabilirea de sușe foarte variate. Mai este nevoie și de metode de testare specifice și foarte sensibile ale substanțelor produse, astfel încît să se reușească izolarea unor compuși originali prezenți în cantități foarte reduse; este mai ales cazul culturii de celule de plante tropicale încă foarte puțin cunoscute pe plan biochimic, al căror prețios patrimoniu genetic ar putea fi astfel conservat în bănci de gene specializate, contribuind în acest fel la descoperirea de noi substanțe terapeutice.

Cunoștințele și experiența dobîndite pînă în prezent în domeniul imobilizării celulelor microbiene și al enzimelor lor, precum și al funcționării acestor bioreactoare își vor aduce, fără îndoială, o contribuție prețioasă la elaborarea unei tehnologii adaptate culturii celulelor vegetale, al căror potențial ridicat în ce privește diversitatea biologică va putea fi exploatat pe plan biochimic (tabelul 3).

Tabelul 3. **Compuși identificați în culturile „in vitro" de celule și țesuturi vegetale și domeniile de utilizare posibilă a acestor compuși (după Hennequin, Steck și Roncucci, 1982)**

Compuși identificați în culturile *in vitro* de celule și țesuturi la cîteva specii vegetale (se face abstracție de orice considerație economică privind producerea lor industrială prin această tehnică)

Specii vegetale	Compușii indentificați
Ammi visnaga	Visnagină [1])
Atropa belladona	Atropină, hiosciamină
Camptotheca acuminata	Camptotecină
Cassia tora	Antrachinonă
Catharanthus roseus (= *Vinca rosea*)	Ajmalină [1], serpentin [1], și alți numeroși alcaloizi indolici dintre care unii lipsesc din planta de origine
Caphalotaxus harringtonia	Cefalotaxină, harringtonină
Coffea arabica	Stigmasterol, campesterol, sitosterol, cafeină, teobromină [1])
Coleus blumei	Acid rozmarinic
Coptis japonica	Berberină, palmitină, coptizină, jatrorrizină, magnoflorină
Datura stramonium (sau *innoxia*)	Hiosciamină, scopolamină și alți alcaloizi tropanici
Digitalis purpurea (sau *lanata*)	Antrachinone
	Stigmasterol, colesterol, sitorsterol și alți numeroși steroizi
	Heterozide cardiotonice

Tabelul 3 (continuare)

Dioscorea deltoïdea	Saponine steroidice dintre care diosgenina [1]
Ephedra foliata (sau *gerardiana*)	Efedrină
Hyoscyamus niger	Hiosciamină, scopolamină şi alţi alcaloizi
Lithospermum erythrorhizon	Sikonină [1] şi alţi pigmenţi
Macleaya microcarpa	Protopină, alocriptină
Matricaria camomilla	Uleiuri esenţiale
Morinda citrifolia	Antrachinone, morindină
Nicotiana tabacum	Nicotină [1] şi alţi alcaloizi
	Ubichinona-10 [1] şi diverse alte chinone (plastochinonă, tocoferol, vitamina K)
	Glutation [1]
	Compuşi fenolici (scopoletină)
	Numeroşi steroli (stigmasterol, sitosterol, campesterol, colesterol), diosgenină
	Numeroase enzime (fosfodiesterază)
	Biomasă
Panax ginseng	Ginsenozide [1]
Papaver bracteatum	Tebaină şi alţi alcaloizi
Papaver somniferum	Codeină, morfină, tebaină, papaverină, narcotină, narceină, protopină, sangvinarină şi diverşi alţi alcaloizi
Rauwolfia serpentina	Rezerpină, rescinamină
Ruta graveolens	Alcaloizi (rutacridonă, diverse metil-acridone)
	Compuşi fenolici (bergapten, psoralen), uleiuri esenţiale, pigmenţi

[1] Cantitatea de substanţă în ţesuturile cultivate *in vitro* (% din greutatea de materie uscată) este egală sau superioară celei care caracterizează ţesuturile plantei de origine.

Domenii de utilizare posibilă (se face abstracţie de orice consideraţie economică deoarece acest mod de producere nu părea competitiv, în 1982, decît în ceea ce priveşte numai vreo douăzeci de compuşi)

Farmacie

Alcaloizi, indolici, tropanici, izochinoleici, fenantrenici, furochinoleici (ajmalicină, atropină berberină, cafeină, codeină, efedrină, harringtonină, hiosciamină, morfină, nicotină, rezerpină scopolamină, serpentină, tebaină, vincamină, vindolină)
Antiinflamatoare
Antileucemice şi antitumorale (camptotecină, thalicarpină, solamarină, cefalotaxină, harringtonină)
Antimicrobiene
Cardiotonice (în special digitalice)
Diuretice
Edulcorante non-glucidice (dihidrocalcone, diterpenoizi, steviozidă, miralină, glicirrhizină, thaumatină).
Enzime
Hemolitice
Inhibitori de enzime (în special inhibitor al proteinazelor fibrinolitice)
Opiacee (codeină, tebaină, narcotină, papaverină, sangvinarină)
Steroli, sapogenine, saponine steroidice
Vasoconstrictoare
Vitamine (acid ascorbic, tiamină, vitamina K)

Agricultură şi alimentaţie

Agenţi care măresc viscozitatea
Aminoacizi
Arome, condimente, mirodenii
Coloranţi

Tabelul 3 (continuare)

Edulcorante nonglucidice
Emulsifianți
Enzime (fosfodiesterază comercializată)
Glucide
Hormoni și stimulatori ai creșterii plantelor
Insecticide
Lipide
Nucleozide, nucleotide
Parfumuri și arome
Peptide și proteine
Pigmenți (clorofilă, carotenoizi, antociane, antrachinone, betanină, xantofile, flavone, flavonoizi și calcone, taninuri)
Uleiuri esențiale (mentă, busuioc, virnanț, granat)

Industria chimică

Acizi organici (cafeic, clorogenic, cinamic, ferulic, oxalic, chinic, shikimic, sinapic și alți vreo zece acizi)
Chinone
Derivați benzoici (acizii: gentistic, vanilic, parahidroxibenzoic), benzopirone (cumarină, maackiainā, pterocarpină), benzochinone (ubichinonă, tocoferol, vitamina K)
Diantrone
Enzime
Furanocromone, furanocumarine
Fenoli
Steroli (campesterol, colesterol, stigmasterol, sitosterol), sapogenine, saponine, steroidice (diosgenină).
Terpene și terpenoizi

Din 1973 și mai ales după rezultatele spectaculoase ale experiențelor de recombinare la nivelul acizilor nucleici în celulele microbiene, aplicarea acestor tehnici la plante a stîrnit un interes din ce în ce mai mare. În S.U.A., de exemplu, cercetători din vreo douăsprezece universități și laboratoare particulare le consacră eforturi și credite însemnate: șase milioane de dolari din partea guvernului federal și între o sută de milioane și un miliard de dolari din partea companiilor particulare în 1981 (Steinhart, 1982, v.p. 224).

Extinderea și mărirea eficacității fixării biologice a azotului atmosferic

Cercetările privind fixarea biologică a azotului atmosferic au fost intensificate în mai multe țări în scopul ameliorării eficacității acestui proces esențial pentru funcționarea ciclului azotului în biosferă și al creșterii productivității plantelor vegetale, dar și în scopul creării unor asociații simbiotice fixatoare de azot, diferite față de cele care există între leguminoase și bacteriile din genul *Rhizobium*. Crearea unor astfel de legături între bacteriile fixatoare și cereale ar putea avea aplicații importante în plan agronomic, ca și transferul de durată mai mare de la bacterii la plante, al genelor fixatoare de azot (Evans și Barber, 1977; Elmerich, 1979).

Microorganisme diazotrofe

Fixarea azotului atmosferic (diazotrofia) este o proprietate a microorganismelor procariote. Xamada Sakaguchi (1980, în Postgate, 1982) ar fi observat acest fenomen la o algă verde unicelulară ecuariotă, izolată dintr-un izvor termal, dar o asemenea observație nu a fost confirmată de alți cercetători. Tabelele 4—6 prezintă speciile, genurile și familiile de microorganisme diazotrofe, libere și simbiotice; tabelul 7 cuprinde speciile bacteriene la care au fost transferate genele fixatoare de azot și care au devenit fixatoare de azot.

Tabelul 4. **Microorganisme heterotrofe libere, fixatoare de azot sau diazotrofe (după Postgate, 1981)**

Familia și genul	Specii
Azotobacteriaceae	
Azomonas	*insignis, macrocytogenes*
Azotobacter	*beijerinckii, chroococcum, halophilus, miscellus, paspali, vinelandii*
Azotococcus	*agilis*
Beijerinckia	*derxii, fluminensis, indica, mobilis*
Derxia	*gummosa*
Xanthobacter	*autotrophicus, flavus*
Bacilaceae	
Bacillus	*macerans, polymyxa*
Clostridium	*acetobutyricum, beijerinckii, butyricum, felsinium, kluyverii, lactoacetophilum, madisonii, pasteurianum pectinovorum, saccharobutyricum, tetanomorphum*
Desulfotomaculum	*orientis, ruminis*
Corynebacteriaceae	
Arthrobacter	*fluorescens*
Enterobacteriaceae	
Citrobacter	*freundii*
Enterobacter	*aerogenes, agglomerans, cloacae*
Erwinia	*herbicola*
Escherichia	*intermedia*
Klebsiella	*aerogenes, oxytoca, pneumoniae*
Methanomonadaceae	
Methylobacter	*capsulatus*
Methylococcus	*capsulatus*
Methylocystis	*parvus*
Methylosinus	*(M. trichosporium = « P. methanitrificans »)*
Propionibacteriaceae	
Propionibacterium	*petersonii, shermanii*
Spirillaceae	
Aquaspirillum	*fasciculus, perigrinum*
Thiobacteriaceae	
Thiobacillus	*ferooxidans*
Familie imprecis definită	
Desulfovibrio	*desulfuricans, gigas, vulgaris*

Tabelul 5. **Microorganisme fotosintetizante libere, fixatoare de azot (după Stewart, 1977 şi Postgate, 1981 şi 1982)**

MICROORGANISME DIAZOTROFE ANAEROBE (fotosinteză anaerogenă)	
Familia şi genul	Specii
Chlorobiaceae	
Chlorobium	*limicola, phaeobacteroides, thiosulfatophilum (= vibrioforme)*
Pelodictyon	*luteulum*
Chromatiaceae	
Amoebobacter	*roseus*
Chromatium	*gracile, minus, minutissimum, vinosum, violascens, warmingii, weissei*
Ectothiorhodospira	*shaposhnikovii*
Thiocapsa	*pfennigii, roseopercina*
Thiocystis	*violacea*
Rhodospirillaceae	
Rhodomicrobium	*vanniellii*
Rhodopseudomonas	*acidophila, capsulata, gelatinosa, globiformis, palustris, sphaeroides, viridis*
Rhodospirilum	*fulvum, molischianum, photometricum, rubrum, tenue*
CIANOBACTERII (fotosinteză aerogenă)	
Anabaena, Calothrix, Chlorogloeopsis, Chroococcidiopsis, Cylindrospermum, Dermocarpa, Fischerella, Gloeothece, Lyngbya, Myxosarcina, Nostoc, Oscillatoria, Phormidium, Plectonema, Pleurocapsa, Pseudanabaena, Scytonema, Spirulina, Synechococcus, Xenococcus (v. fig. 6)	

Tabelul 6. **Microorganisme simbiotice, fixatoare de azot**

MICROORGANISME DIAZOTROFE HETEROTROFE	
Simbioze fără nodozităţi pe rădăcini (rizocenoze): *Azotobacter paspali (Paspalum notatum); Azospirillum lipoferum, A. brasilense (Digitaria decumbens)*	
Simbioze cu nodozităţi pe rădăcini: *Rhizobium* spp. — leguminoase; *Rhizobium* — Angiosperme neleguminoase *(Trema cannabina);* actinomicete — Angiosperme neleguminoase *(Alnus glutinosa, Casuarina equisetifolia, Hippophaë rhamnoides, Myrica gale)*	
CIANOBACTERII Genul sau specia (ficobiont)	Vegetale simbiotice
Anabaena, Nostoc, Tolypothrix	Licheni *(Collema, Peltigera,* etc.*)*
Nostoc	Hepatice *(Anthoceros,* Blasia)
Anabaena azollae	Ferigă *(Azolla* spp.)
Nostoc (Anabaena)	Cicadale *(Cycas, Macrozamia* etc.)
Nostoc	Angiospermă *(Gunnera)*

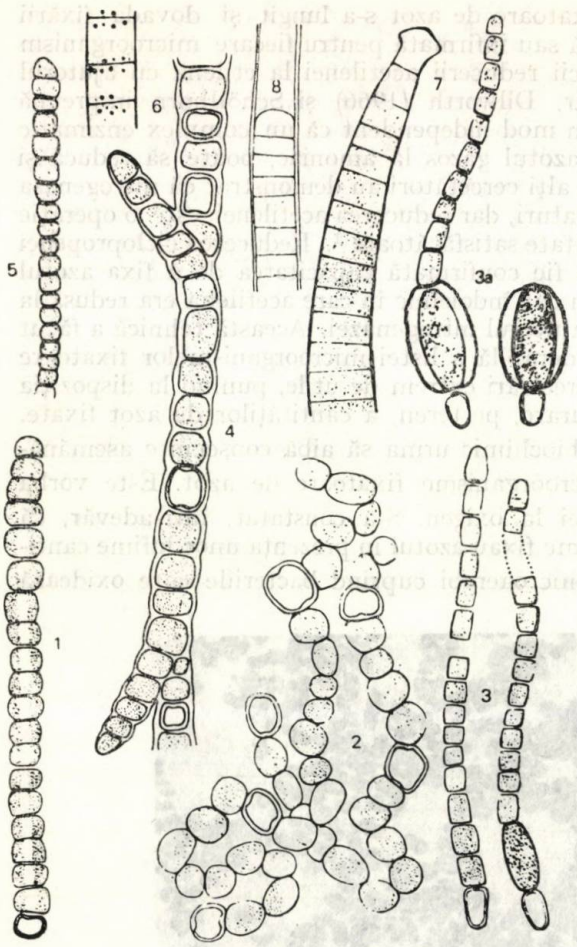


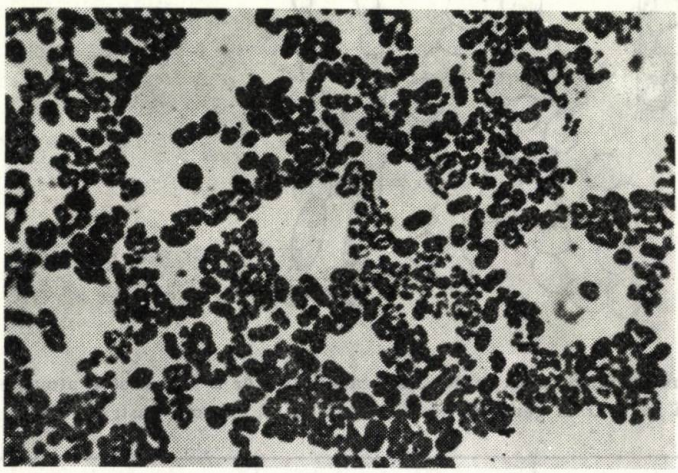
Fig. 6. Cianobacterii filamentoase heterociste și neheterociste (A. Sasson, 1959):
1 — *Anbaena constricta* (filament cu un heterocist terminal, × 1 000);
2 — *Nostoc punctiforme* (× 1 580);
3 — *Cylindrospermum alatosporum* (× 980) 3a. C. *alatosporum*, tricome cu spori adulți și heterociste terminale (x 980);
4 — *Hapalosiphon welwistchii* (filament ramificat cu heterociste intercalate, × 1 500);
5 — *Phormidium foveolarum* (cianobacterie neheterocistată, × 2250);
6 — *Oscillatoria formosa* (cianobacterie neheterocistată, detaliu din celule, × 2 250);
7 — *Oscillatoria amoena* (× 2 000);
8 — *Lyngbya aerugineo-caerulea* (cianobacterie neheterocistată, x 1 270).

Tabelul 7. **Microorganisme care au dobîndit capacitatea de a fixa azotul atmosferic în urma unui transfer al genelor fixatoare de azot, *nif* (după Postgate, 1981)**

Suşa diazotrofă	Suşa receptoare a genelor nif	Referire bibliografică
Klebsiella pneumoniae (oxytoca) suşa M5a1	Escherichia coli	Dixon şi Postgate (1972)
	Klebsiella aerogenes	Tubb (1974)
	Salmonella typhimurium	Postgate şi Krishnapillai (1977)
	Serratia marcescens	Krishnapillai şi Postgate (1980)
	Erwinia herbicola	Krishnapillai şi Postgate (1980)
	Pseudomonas sp.	Mergeay şi Gerits (1978)
Rhizobium trifolii suşa T1K	K. aerogenes 418	Dunican şi Tierney (1974)
	E. coli	Skotnicki şi Rolfe (1978)
Rhizobium trifolii suşa T1	Agrobacterium tumefaciens	Stanley şi Dunican (1979)

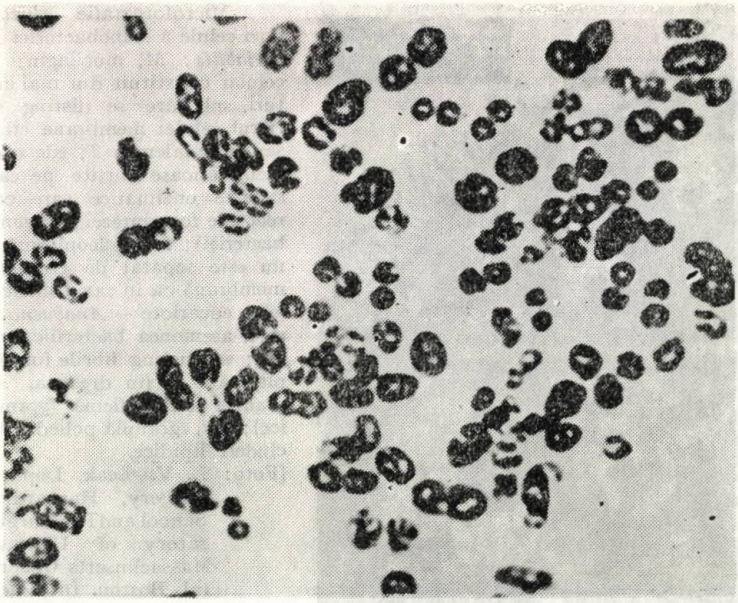
Lista microorganismelor fixatoare de azot s-a lungit și dovada fixării azotului a fost în plus confirmată sau infirmată pentru fiecare microorganism studiat, datorită utilizării tehnicii reducerii acetilenei la etilenă cu ajutorul microbilor diazotrofi. Întradevăr, Dilworth (1966) și Schöllhorn împreună cu Burris (1967) au descoperit în mod independent că un complex enzimatic (sau nitrogenaza) care reduce azotul gazos la amoniac, poate să reducă și acetilena la etilenă. După aceea, alți cercetători au demonstrat că nitrogenaza poate să reducă mai multe substraturi, dar reducerea acetilenei este o operație care se realizează rapid și dă rezultate satisfăcătoare [1]. Reducerea ciclopropenei era mai specifică și permitea să fie confirmată capacitatea de a fixa azotul sau, dimpotrivă, să fie respins un caz îndoielnic în care acetilena era redusă la etilenă pe cale chimică și nu cu ajutorul nitrogenazei. Această tehnică a făcut astfel posibilă modificarea considerabilă a listei microorganismelor fixatoare de azot, căreia i-au fost aduse precizări extrem de utile, punînd la dispoziția cercetătorilor o unealtă de măsurare, pe teren, a cantităților de azot fixate.

O altă descoperire în plan biochimic urma să aibă consecințe asemănătoare asupra numărului de microorganisme fixatoare de azot. Este vorba despre sensibilitatea nitrogenazei la oxigen. S-a constatat, într-adevăr, că mai multe grupe de microorganisme fixau azotul în prezența unor infime cantități de oxigen; acești fixatori microaerobi cuprind bacteriile care oxidează



Azotobacter chroococcum este o bacterie diazotrofă liberă care poate fi izolată din sol și se poate găsi din abundență în vecinătatea rădăcinilor (rizosferă) plantelor cultivate. Microfotografia de sus reprezintă o sușă de *Azotobacter chroococcum* proaspăt izolată dintr-un sol de grădină și cultivată pe mediu cu agar al lui Beijerinck. Colorarea cu eritrozină a frotiului bacterian pune în evidență granule metacromatice intracelulare caracteristice acestei specii bacteriene. × 1 200.
Foto: A. Sasson.

[1]) Activitatea nitrogenazei este exprimată în nanomoli de acetilenă redusă sau de etilenă produsă pe oră și pe gram de materie uscată; ea poate fi apoi transformată în kilograme de azot fixat la hectar și pe an.



Microfotografia reprezintă o altă suşă de *Azotobacter chroococcum*, izolată dintr-un sol arid (sierozem) din Maroc, apoi cultivată pe mediu cu agar al lui Ashby, după 72 de ore Colorarea frotiului bacterian cu eritrozină.
× 2 500
[Foto: A.Sasson.]

metanul, spirili (*Aquaspirillum* şi *Azospirillum*), *Xanthobacter autotrophicus* şi *X. flavus* (mai înainte *Corynebacterium autotrophicum* şi *C. flavum*), *Thiobacillus ferrooxidans*, cianobacterii neheterociste şi microaerobe (*Oscillatoria*, *Plectonema*), bacterii coliforme care fixează azotul numai în anaerobioză (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*).

Cercetările de natură taxonomică şi fiziologică au arătat că proprietatea de fixare şi de asimilare a azotului atmosferic sau diazotrofia era arareori universală în interiorul unor genuri microbiene şi adesea chiar în interiorul unui gen sau al unei specii determinate, microbii consideraţi ca fixatori simbiotici (*Rhizobium*, *Frankia*, de exemplu) erau capabili să fixeze azotul *ex planta*, însă numai în condiţii particulare (totuşi, anumite specii par să fie diazotrofe simbiotice obligatorii, ca majoritatea suşelor de *Rhizobium leguminosarum* şi de *R. meliloti*); caracterul diazotrof al genului *Pseudomonas* nu era încă pe deplin stabilit, dar, după părerea specialiştilor, această proprietate metabolică putea foarte bine să afecteze pseudomonadaceele.

Lista microrganismelor fixatoare de azot va cunoaşte şi alte schimbări în lumina rezultatelor cercetărilor biochimice şi fiziologice; evoluţia ei între începutul anilor '60 şi sfîrşitul anilor '70 demonstra progresele cunoştinţelor fundamentale, care au avut consecinţe însemnate în plan teoretic şi practic.

Microfotografie electronică a unei celule a cianobacteriei *Anabaena variabilis*: *M*, mucilagiu; *L*, perete celular constituit din mai multe straturi, sub care se disting spre interiorul celulei membrana citoplasmică sau plasmalema; *T*, tilacoizi (sacule membranoase turtite pe care se află sisteme enzimatice care catalizează reacțiile fotosintezei aerogene a cianobacteriei); *N*, nucleoplasmă (ADN-ul nu este separat de citoplasmă cu o membrană ca în cazul nucleului celulelor eucariote — *Anabaena variabilis* este, asemenea bacteriilor, o procariotă; se disting fibrile fine în nucleoplasmă — *F* (în dreapta, sus); *CG*, granule de cianoficină (granule proteice); *PB*, granulă poliedrică; *L*, includeri lipidice.
[Foto: L. V. Leak, Department of Surgery, Harvard Medical School andThe Surgical Laboratory of Ulstrastructure, Massachusetts General Hospital, Boston. În: Bacteriological Reviews, vol. 37, nr. 1, 1973, p. 32—101.]

Aspecte biochimice ale diazotrofiei

Punerea în evidență de către cercetătorii firmei americane DuPont (Carnaham, Mortenson, Mower și Castle, 1960; în Postgate, 1980) a unei activități nitrogenazice în extractele acelulare de *Clostridium pasteurianum* a fost punctul de plecare al cercetărilor biochimiei fixării azotului, mai ales asupra enzimei implicate și asupra modului ei de acțiune. Aceste experiențe urmau să se desfășoare în absența aerului, din cauza sensibilității foarte mari a nitrogenazei la oxigen. La începutul anilor '60, numai cîțiva microbiologi, specialiști în studiul microbilor anaerobi stricți și un număr mic de chimiști care studiau unii compuși sensibili la oxigen aveau experiența necesară pentru a aborda acest gen de cercetări. Dacă numai cîțiva nanomoli de oxigen puteau să deterioreze cîțiva nanomoli dintr-un compus chimic cu o greutate moleculară cuprinsă între 100 și 1 000, sau să distrugă o mie de celule în interiorul unei populații de 10^{10} microbi anaerobi, ceea ce era în fond acceptabil, consecințele erau, în schimb, catastrofale în cazul nitrogenazei, a cărei greutate moleculară este cuprinsă între 2×10^4 și 2×10^5. Perfecționarea tehnicilor de cromatografie, electroforeză și fracționare și folosirea lor în absența aerului

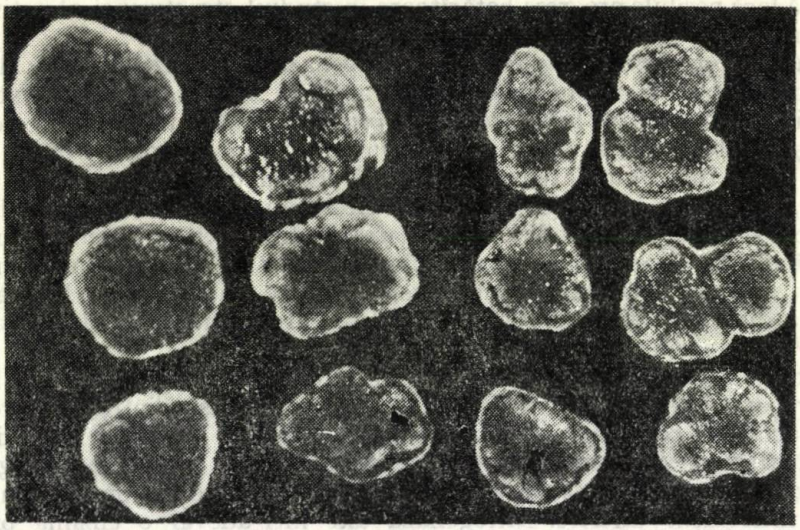
aveau să facă posibile progrese hotărîtoare în studiul structurii și al activității nitrogenazei.

După *Clostridium pasteurianum*, nitrogenaza a fost izolată ușor de alte specii de bacterii anaerobe fixatoare de azot, în timp ce această extracție era mai dificilă în cazul lui *Azotobacter vinelandii*, care este o bacterie aerobă. Bulen și colaboratorii săi (Bulen ș.a., 1964, 1965; în Postgate, 1980 a) de la Charles Kettering Foundation au reușit să demonstreze, prin izolarea nitrogenazei, că enzima putea să primească electronii dithionitului de sodiu, să tolereze oxigenul și să catalizeze degajarea de hidrogen în absența azotului. Această ultimă observație a permis biochimiștilor să pună la punct un test rapid și sigur al activității enzimatice, și anume eliberarea de hidrogen în prezența dithionitului și ATP-ului. Astfel se putea renunța la utilizarea azotului $^{15}N_2$ și a manometrului lui Warburg.

Nitrogenaza a fost izolată, în 1981, din circa treizeci de microbi sub forma unui preparat brut și a fost purificată pornind de la șase dintre ei. Proprietățile acestui complex enzimatic sînt aproape identice la diverșii microbi fixatori de azot. Cele două proteine care constituie nitrogenaza formează în general o enzimă activă, chiar atunci cînd ele provin din două genuri microbiene diferite. Nitrogenaza este într-adevăr o enzimă binară, constituită din două metaloproteine brune, a căror activitate conjugată este indispensabilă reducerii azotului la amoniac. Nitrogenaza este considerată una dintre enzimele cele mai complexe, al cărui substrat este un compus simplu. Este, de altfel, interesant de observat că acesta este și cazul enzimelor care catalizează reacții ce implică metanul, gazul carbonic, oxigenul sau ionul sulfat.

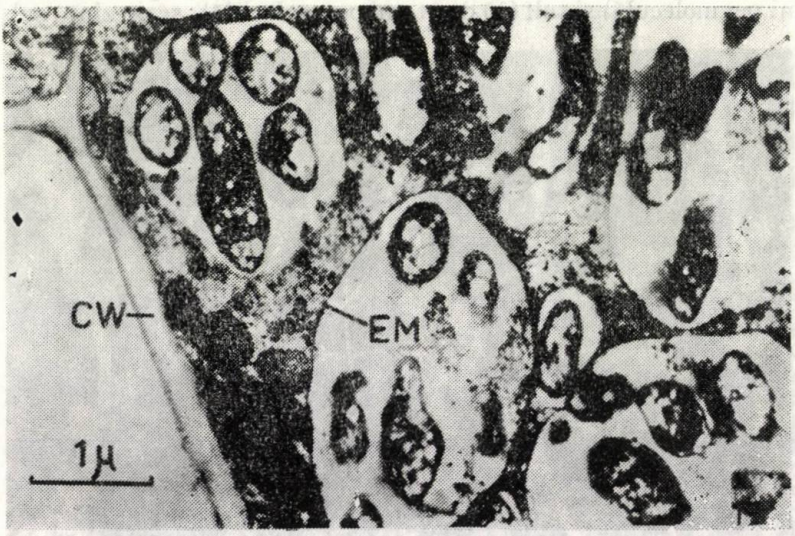
Molibdenoferoproteina (MoFe-proteina) are o greutate moleculară de aproximativ $2{,}2 \times 10^5$; ea conține molibden (doi atomi per moleculă), fier (32 atomi per moleculă) și sulf (30 de atomi per moleculă); se prezintă sub forma

Nodozități pe rădăcini de *Vigna sinensis*.
Nodozitățile unde se află găzduite bacteriile fixatoare de azot atmosferic *(Rhizobium)*, formează șiraguri mai ales pe rădăcina principală a acestei specii de leguminoasă tropicală (niébé). Bacteriile fac parte din grupa numită *cow-pea*.



Secțiuni transversale în nodozități pe rădăcini de *Vigna sinensis*.

Se disting pe aceste secțiuni membrana periferică a nodozității, de culoare albicioasă, în timp ce centrul nodozității este roz intens, datorită prezenței unei proteine hemice, leghemoglobina. Această colorație indică faptul că nodozitatea este funcțională, că ea fixează azotul atmosferic.



Microfotografia electronică a unei secțiuni într-o nodozitate pe rădăcina unei leguminoase.

La interiorul nodozității, rizobacteriile dobîndesc o morfologie specială (bacteroizi) și sînt adesea grupate în pachete separate de membrane (*EM*). Pe această microfotografie se remarcă peretele pecto-celulozic al unei celule a rădăcini (*CW*).

unui tetramer $\alpha_2 \beta_2$. Feroproteina (Fe-proteina) are o greutate moleculară de aproximativ 5×10^4; ea conține fier (patru atomi per moleculă) și sulf (patru atomi per moleculă); este vorba tot despre un tetramer de tip α_2.

Specialiștii consideră că azotul se fixează de MoFe-proteină, care este numită de cîțiva dintre ei (Burris ș.a.) dinitrogenaza (de la dinitrogen, care este numele chimic corect al azotului; Fe-proteina este atunci numită dinitrogenaza-reductaza, dar o asemenea nomenclatură nu a fost acceptată de toți specialiștii). Unirea azotului se face probabil la nivelul molibdenului, într-un fragment separabil de proteina numită „FeMoco". Cele două proteine constitutive ale nitrogenazei sînt distruse de oxigen în mod rapid și ireversibil.

În afara acetilenei, nitrogenaza este capabilă să reducă alte substanțe în locul azotului, inclusiv ionii de hidrogen și să degaje hidrogen în acest caz.

Dinitrogen	$N_2 \longrightarrow NH_3$
Acetilenă	$C_2H_2 \longrightarrow C_2H_4$ (etilenă)
Acid cianhidric	$HCN \longrightarrow CH_4 + NH_3 + CH_3NH_2$
Izocianură de metil	$CH_3NC \longrightarrow CH_4 + CH_3NH_2 +$ produși cu doi atomi de carbon
Nitrură	$HN_3 \longrightarrow N_2 + NH_3 + N_2H_4$
Oxigen azotos	$N_2O \longrightarrow N_2 + H_2O$
Ciclopropenă	$\Delta \longrightarrow \Delta + CH_3CH = CH_2$
Ioni hidrogen	$H_3O^+ \longrightarrow H_2$

Reducerea acetilenei la etilenă a permis punerea la punct și perfecționarea unui test de laborator și a unei metode de încercare pe teren pentru evidențierea fixării azotului și pentru evaluarea cantităților de azot fixate.

În celulă, electronii necesari reducerii azotului la amoniac sînt transferați nitrogenazei cu ajutorul unor proteine specifice, ferodoxinele și flavodoxinele. Energia necesară este furnizată sub formă de ATP, fie că substratul îl constituie azotul sau unul dintre substraturile citate anterior. Consumul de ATP de către nitrogenază a fost pus în evidență cînd enzima de la *Clostridium pasteurianum* a fost izolată de Carnahan ș.a., dar evaluarea exactă a acestui consum a fost făcută în urma utilizării unui sistem de reacție care regenerează ATP-ul (cum sînt creatin-fosfatul și creatin-kinaza). Acest consum este ridicat, de ordinul 12—15 ATP/N_2, și cauzele acestui consum foarte mare nu sînt în întregime elucidate.

În ceea ce privește degajarea de hidrogen, aceasta antrenează o pierdere de energie și este considerată ca o reacție care reduce eficacitatea întregului proces de fixare a azotului. Totuși, mai multe bacterii aerobe ce fixează azotul posedă o hidrogenază care reciclează hidrogenul produs de nitrogenaza *in vivo* (Pedrosa ș.a., 1982), astfel încît reutilizarea acestui hidrogen produce mai mult ATP și ameliorează eficacitatea fixării azotului. Dixon (1972; în Pedrosa ș.a., 1982) a sugerat că activitatea acestei hidrogenaze proteja nitrogenaza de inactivare de către oxigen, că permitea să se recupereze, indirect, prin fosforilare oxidativă, o parte din energia pierdută ca urmare a eliberării de hidrogen de către nitrogenază și că împiedica inhibarea de către hidrogen a reducerii azotului. Primele două ipoteze au fost verificate în cazul lui *Azoto-*

bacter chroococcum (Walker și Yates, 1978), al bacteroizilor de *Rhizobium japonicum* (Elmerich ș.a., 1979) și de *Anabaena cylindrica* (Bothe ș.a. 1977). În ceea ce privește rolul hidrogenului în inhibarea reducerii azotului, Walker și Yates (1978; Pedrosa ș.a., 1982) au arătat că hidrogenul degajat de nitrogenaza de *Azotobacter chroococcum* se împrăștie prea repede pentru a putea fi inhibată reducerea azotului.

Genul *Azospirillum* cuprinde bacterii aerobe fixatoare de azot care posedă, de asemenea, o hidrogenază capabilă să favorizeze activitatea nitrogenazică (reducerea acetilenei), numai atunci cînd substraturile carbonate lipsesc din celulele bacteriene. Aceste substraturi carbonate nu inhibă totuși respirația dependentă de hidrogen. Pe de altă parte, se pare că reciclarea hidrogenului de către hidrogenază la *Azospirillum brasilense* nu poate să protejeze nitrogenaza de inactivarea datorată oxigenului (Pedrosa ș.a., 1982).

Importanța reciclării hidrogenului de către hidrogenază este atestată de faptul că mutanți de *Rhizobium japonicum*, ale căror gene *hup* (hydrogenase uptake) prezentau deficiențe, formau asociații simbiotice a căror fixare de azot, măsurată la plantele cultivate în vase și în seră, era mai slabă (Evans ș.a., 1980; în Postgate, 1982). În schimb, sușele *hup*$^+$ de *R-japonicum* puteau să crească în mod autotrof folosind hidrogenul ca substrat energetic. Multe sușe de *Rhizobium* nu posedă aceste gene *hup* sau le exprimă foarte slab. La *R. leguminosarum*, aceste gene se află într-o plasmidă.

Aspecte fiziologice esențiale ale diazotrofiei

Un microb care fixează azotul degradează, datorită consumului însemnat de ATP de către nitrogenază, mai mult substrat energetic decît dacă ar trebui să asimileze compuși amoniacali. Totuși, cantitatea de energie necesară reducerii și asimilării nitraților nu este atît de diferită de cantitatea indispensabilă reducerii și asimilării azotului. Reciclarea hidrogenului degajat de nitrogenază în scopul producerii de ATP prin fosforilare oxidativă conferă microbilor ce posedă acest mecanism o eficacitate superioară în fixarea și reducerea azotului.

Dificultatea fiziologică esențială a fixării azotului este protecția obligatorie a nitrogenazei împotriva daunelor cauzate de oxigen. Această sensibilitate la oxigen era cunoscută de mult timp la *Azotobacter* (Prazmowski, 1912; în Postgate, 1980) și biochimiștii și-au dat seama că bacteriile aerobe aveau aceleași probleme ca și ei cînd manipulau nitrogenaza și se străduiau să o protejeze de oxigen. În cazul cianobacteriilor, dificultatea era și mai serioasă, deoarece aceste organisme fotosintetizante produceau oxigen (fotosinteză aerogenă). Cercetările întreprinse în acest domeniu aveau să arate că dificultatea respectivă putea fi întîlnită la toți fixatorii de azot, inclusiv la organismele simbiotice.

Există mai multe mijloace de a evita acțiunea inhibitoare a oxigenului. Multe specii de bacterii aerobe se comportă ca microaerofile sau anaerobe atunci cînd fixează azotul; numeroase sușe de *Rhizobium* (în general cele cu dezvoltare lentă), care erau considerate simbiotice obligatorii cînd fixau azotul, sînt, de fapt, în aceste condiții, niște microaerofile foarte sensibile și pot fixa azotul în stare liberă (*ex planta*) la tensiuni foarte slabe de oxigen. Bac-

teriile aparţinînd genului *Azotobacter* au o proteină care protejează nitrogenaza de contactul cu oxigenul şi respiraţia lor intensă (degradare rapidă a substraturilor carbonate) antrenează un consum crescut de oxigen. Cianobacteriile cu heterociste se caracterizează prin separarea fotosintezei de fixarea azotului, care are loc numai în herociste şi care nu este inhibată de oxigenul degajat prin fotosinteză. În nodozităţile fixatoare de azot ale rădăcinilor de leguminoase, difuziunea oxigenului este încetinită de învelişurile nodozităţii şi urmele acestui gaz sînt recuperate de leghemoglobină.

Oxigenul nu este numai un inhibitor al activităţii nitrogenazei, ci şi un regulator al biosintezei ei, astfel încît enzima nu este sintetizată în condiţii puţin favorabile din punct de vedere fiziologic fixării azotului.

Genetica microorganismelor diazotrofe libere şi simbiotice

Organizarea genelor fixatoare de azot

Studiul genelor fixatoare de azot s-a efectuat pe *Klebsiella pneumoniae* (suşa M5al), iar în cursul anilor '70 au fost realizate progrese spectaculoase. Este adevărat că încă din 1959 au fost izolaţi şi caracterizaţi din punct de vedere biochimic mutanţi de bacterii fixatoare de azot, dar veritabilele cercetări genetice au luat avînt o dată cu demonstraţia făcută de Streicher (Streicher ş.a., 1971) în S.U.A. şi de Dixon în Marea Britanie (Agricultural Research Council Unit for Nitrogen Fixation, Universitatea din Sussex, din Brighton; Dicon şi Postgate, 1971) cu privire la transferul genelor fixatoare de azot, numite gene *nif*, la *Klebsiella pneumoniae*. Dixon (1972) şi Postgate (1980 a), au reuşit apoi să transfere aceste gene în celulele de *Escherichia coli*. Aceste lucrări de început aveau să fie urmate de o înmulţire a cercetărilor asupra geneticii genului *Rhizobium*, a prezenţei genelor *nif* la diverşi microbi diazotrofi şi asupra relaţiilor între genetica leguminoaselor şi cea a bacteriilor simbiotice.

Deoarece experienţele nu trebuiau să fie făcute în absenţa oxigenului (doar dezvoltarea suşelor microbiene urma să se facă în anaerobioză), geneticienii au realizat progrese importante în paralel cu cele înregistrate în domeniile biochimiei şi fiziologiei procesului. Astfel a fost studiată, în S.U.A., reglarea fixării şi asimilării azotului de către amoniac şi prin intermediul glutaminsintetazei, atît pe planul genetic cît şi cel biochimic, încît în 1976 trei echipe de cercetători au demonstrat simultan participarea glutaminasintetazei la reglarea funcţionării genelor *nif* (Shanmugam ş.a., 1976; Cannon ş.a., 1976; Brill, 1976, Postgate, 1982). De observat că glutamin-sintetaza se află controlată de gene care nu sînt asociate genelor *nif*.

Pentru a determina cu exactitate natura genelor *nif* şi organizarea lor în cromozomul bacteriei, au fost efectuate lucrări de cartografie genetică fină, la care au contribuit noile tehnici de recombinare a acizilor nucleici. S-a stabilit aşadar că genele *nif* formează un ansamblu situat între genele biosintezei histidinei (*his*) şi cele ale absorbţiei acidului shikimic (*shi A*). Asocierea pe cromozomul de *K.pneumoniae* a genelor *nif* şi *his* a înlesnit elaborarea de plasmide autotransmisibile care poartă regiunea *his-nif* (Cannon ş.a., 1976; Dixon ş.a., 1976; Postgate şi Cannon, 1981). Plasmida pRD1 purta, de exem-

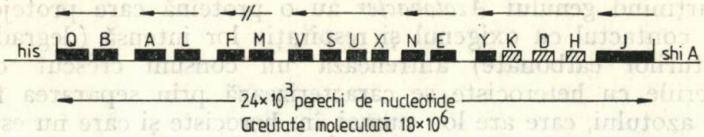


Fig. 7. Schema organizării genelor *nif* pe cromozomul de *Klebsiella pneumoniae* (1981). Literele majuscule desemnează genele (cistroni), ansamblul *nif* fiind cuprins între genele biosintezei histidinei (*his*) și cele ale absorbției acidului shikimic (*sgi A*). Săgețile desemnează operonii și indică sensul transcripției acestora din urmă. În 1981, nu se știa dacă genele F și M formează doi operoni sau unul singur. În schimb erau cunoscute dimensiunile majorității acestor gene

plu, genele cromozomice *gnd*, *rfb*, *his*, *nif* și *shi A* ; ea a servit, alături de multe alte plasmide cu structură analogă, la efectuarea unor analize de complementare și la cartografierea mutațiilor la nivelul genelor *nif*. Această plasmidă a servit, de asemenea, la mai buna înțelegere a expresiei genelor *nif* de *K. pneumoniae* în alte gene bacteriene, și a furnizat ADN-ul pentru clonarea genelor *nif*.

Această clonare a fost înlesnită de elaborarea de plasmide de mici dimensiuni, constituite de fragmente provenind din sciziunea prin endonucleaze de restricție a ADN-ului și a căror totalitate acoperea ansamblul regiunii *nif* (Cannon ș.a. 1977 ; Postgate și Cannon, 1981). Puhler ș.a. (1979) au izolat, de asemenea, cloni conținînd toate genele ansamblului *nif*, în timp ce *Mac Neil* și *Brill* (1980) au identificat o serie de bacteriofagi transductori λ *nif*, care purtau în colectiv ansamblul genelor *nif* (Postgate și Cannon, 1981). Toate aceste cercetări au condus la elaborarea unei hărți fizice a genelor *nif*, care corespundea în totalitate hărții genetice.

În 1981, numărul genelor *nif* era de 17 și ele erau organizate în șapte sau opt unități de transcripție (operoni), dintre care una (J) era monocistronică (fig.7). Brill (1980, Postgate, 1982) a inclus două gene suplimentare: *nif* R între L și F și *nif W* între F și M.

Organizarea genelor *nif* ale altor microbi diazotrofi liberi la care au fost izolați mutanți *nif*⁻ (*Azotobacter vinelandii*, *Azospirillum lipoferum*, *Clostridium pasteurianum*, *Rhodopseudomonas capsulata* și cîteva cianobacterii) era foarte înrudită cu cea de *Klebsiella pneumoniae*.

Produși ai genelor fixatoare de azot

Funcționarea genelor *nif* și natura produșilor sintetizați sub controlul lor avea să rețină apoi atenția cercetătorilor. Accentul se punea atunci pe genetica biochimică, deoarece, în definitiv, era vorba de a se izola polipeptide sau proteine și de a se elucida funcția lor. Numeroasele mutații obținute la nivelul tuturor genelor *nif* (mutații punctiforme, deleții, mutații polare și mutații de inserție) au contribuit la elucidarea naturii produșilor genelor *nif*. O genă străină (*lac Z*) a fost chiar fuzionată cu fiecare din operonii *nif* și o asemenea operație a înlesnit studierea reglării acestor operoni (Dixon ș.a., 1980; Zhu și Brill, 1980; Postgate, 1982).

Tabelul 8 rezumă produșii genelor *nif* și rolul lor, așa cum erau cunoscuți în 1981. Operonul HDKY conduce sinteza proteinelor nitrogenazei și genele A și L sînt gene de reglare.

Tabelul 8. **Produși ai genelor *nif* și rolul lor la *Klebsiella pneumoniae* (după Kennedy ș.a., 1981; Postgate 1982)**

Gena	Greutate moleculară (n 10^3)	Rol
Q	?	Necunoscut
B	?	Intervine în sinteza sau elaborarea de FeMoco
A	57	Reglare: produsul genei *nif* A activează alți operoni
L	45	Reglare
F	17	Flavoproteina care intervine în transferul electronilor la nitrogenază
M	28	Intervine în elaborarea Fe-proteinei
V	42	Influențează asupra specificității MoFe-proteinei
S	45	Necunoscut
U	32	Necunoscut
X	18	Nedefinit genetic: prezența dedusă din harta fizică și din clonarea ADN-ului *nif*
N	50	Asemănător lui B
E	46	Asemănător lui B
Y	19	Descoperit ca în cazul lui X
K	60	Conduce sinteza subunității β a MoFe-proteinei
D	56	Comandă sinteza subunității α a MoFe-proteinei
H	35	Comandă sinteza subunității Fe-proteinei
J	120	Intervine, poate, în transferul electronilor la nitrogenază

Reglajul genelor fixatoare de azot

Reglajul genelor *nif* este complex. Amoniacul și alți compuși azotați, dintre care nitrații și aminoacizii, inhibă expresia activității nitrogenazei. O aerisire puternică a mediului de cultură inhibă, de asemenea, această expresie. Azotul nu este necesar inducției genelor *nif*, deoarece acestea sînt exprimate în celulele cultivate într-o atmosferă de argon (Parejko și Wilson, 1970; Postgate și Cannon, 1981). Expresia genelor *nif* este mai degrabă rezultatul unei derepresiuni decît al unei inducții.

Toți produșii genelor *nif* lipsesc din culturile făcute în prezența amoniacului (Eady ș.a., 1978; Postgate și Cannon, 1981) și ARN-ul mesager corespondent (*nif*) nu este decelat în aceste culturi prin tehnica hibridării cu ADN-complementar (Janssen ș.a., 1981; Postgate și Cannon, 1981).

Cînd se adaugă amoniac la o cultură complet dereprimată se produce o represiune rapidă a fenotipului Nif, iar activitatea nitrogenazică precum și proteinele enzimatice dispar în circa patruzeci de minute (Collmer și Lamborg, 1976; Postgate și Cannon 1981).

În prezența amoniacului, glutamin-sintetaza reacționează cu ATP-ul și se pare că își pierde funcția enzimatică și rolul reglator. Glutamin-sintetaza este comandată de o genă (*gln A*) situată departe de genele *nif*; două alte gene *gln L* și *gln G*, sînt unite cu *gln A*, iar adevărații agenți de reglare vor fi produșii genelor *gln*, și nu glutamin-sintetaza.

Oxigenul dizolvat în mediul de cultură reprimă sinteza nitrogenazei la *Klebsiella pneumoniae* și, în general, la bacteriile aerobe, există totuși mecanisme care protejează nitrogenaza de pagubele provocate de oxigen. Mecanismul represiunii cu ajutorul oxigenului pare independent de cei al represiunii cu ajutorul amoniacului la organismele studiate (Hill ș.a., 1981). Operonul *nif* HDK care conține genele de structură ale nitrogenazei, este mai sensibil la represiunea prin oxigen decît operonul *nif* LA (genele reglatoare). După părerea lui Hill ș.a. (1981), un produs al unei gene reglatoare *nif* intervine în mecanismul de acțiune a oxigenului asupra sintezei nitrogenazei.

O dată devenit funcțional ansamblul genelor *nif*, datorită produsului sau produșilor genelor *gln*, operonii individuali care constituie acest ansamblu sînt supuși unor procese de reglare făcînd să intervină produșii genelor *nif A* și *nif L*, și poate și ai altor gene. Buchanan-Wollaston ș.a. (1981) au demonstrat că produșii genelor *A* și *L* erau un inductor și, respectiv, un represor al inițierii transcripției tuturor operonilor ansamblului *nif*, în afara celei a operonului *nif LA*. Acești cercetători au elaborat plasmide care exprimă gena *nif A* în mod constitutiv și au observat, în sușele de *K. pneumoniae* transformate de aceste plasmide, că în absența proteinei *nif L* expresia genei *nif A* era suficientă pentru a activa expresia genelor *nif*, chiar în prezență de oxigen și azot combinate. Proteina *nif* A este termosensibilă, ceea ce explică absența expresiei genelor *nif* la 37°C.

Molibdatul nu este un agent de reglare a genelor *nif*, dar o molibdenoproteină intervine probabil în reglarea a cel puțin unuia dintre operonii de *Klebsiella pneumoniae* (*nif* YKDH). Proteinele de transport și de punere în rezervă a molibdenului sînt prezente la *Clostridium pasteurianum* (Elliott și Mortenson, 1977; Postgate, 1982) și la alți microbi diazotrofi. În plus, alte sisteme enzimatice (ca nitrat-reductaza) necesită incorporarea de molibden, ceea ce poate genera fenomene de competiție. În cazul MoFe-proteinei nitrogenazei, atomul de molibden se află inclus în fragmentul „FeMoco" și produșii genelor *nif B*, *N* și *E* intervin în incorporarea finală de „FeMoco".

În definitiv, reglarea genelor *nif* de *Klebsiella pneumoniae* este făcută atît de genele *nif A* și *nif L* cît și de gene care se află departe de ansamblul *nif* (genele *gln*). Alte gene îndepărtate par să intervină în expreisa genelor *nif*: este vorba de *nar D* (care intervine în incorporarea molibdenului), de *unc* și de o genă a operonului *his* (care acționează asupra furnizării de ATP), și de o genă situată lîngă *trp*, numită *nim*, al cărui rol nu este încă bine definit (Postgate, 1982).

Genetica microorganismelor diazotrofe simbiotice

Genetica speciilor de *Rhizobium*, cu dezvoltare lentă sau rapidă, este un domeniu de cercetare la fel de activ ca domeniul avînd ca obiect *Klebsiella pneumoniae*.

Stabilirea hărții genetice a speciilor de *Rhizobium* prin tehnicile clasice a arătat că *Rhizobium leguminosarum*, *R. phaseoli* și *R. trifolii* au o organizare a genelor foarte apropiată iar cea de *R.meliloti* nu era nici ea foarte deosebită. Krol, Hontelez, Roozendaal și Van Kammen (1982) au arătat mai ales că genele subunităților protidice care constituie molibdenoferoproteina și fero-

proteina nitrogenazei formau un singur operon în cazul lui *Rhizobium leguminosarum*, la fel ca în cazul lui *Azotobacter vinelandii* și *Klebsiella pneumoniae*. Acești cercetători din Secția de Biologie Moleculară a Universității de Agricultură din Wageningen (Olanda), au utilizat în experiențele lor plasmida pSA30, care este o plasmidă recombinată conținînd genele de structură a nitrogenazei de *K. pneumoniae* și care le servea drept „sondă" pentru a localiza în celulele bacteriene acei ARN-mesageri corespondenți genelor de structură.

În urma descoperirii unor plasmide mari în celulele de *Rhizobium leguminosarum*, *R. meliloti* și *R. trifolii* (Nuti ș.a. 1979, Dénarié ș.a., 1981; Hooykaas ș.a., 1981; Postgate, 1982; Krol ș.a., 1982) s-a demonstrat că pe aceste plasmide se aflau nu numai genele de structură a nitrogenazei ci și cele care determinau formarea nodozităților la o specie particulară de leguminoasă. Krol, Hontelez și Van Kammen (1982) au arătat că, în șase sușe de *Rhizobium leguminosarum*, genele *nif* se aflau pe o singură plasmidă (ei au folosit ca „sondă" ADN-ul de *R. meliloti* care purta aceste gene *nif* și care se încrucișa prin hibridare cu ADN-ul complementar de *R. leguminosarum*); greutățile moleculare ale acestor plasmide variau între 130×10^6 și 550×10^6. Cercetătorii olandezi au observat în plus că, atunci cînd bacteriile se transformau în nodozități de bacteroizi care fixau azotul, era exprimată numai plasmida *nif* și nu alte plasmide ale sușei PRE de *R. leguminosarum*, ceea ce confirma rolul ei esențial în eficiența asocierii simbiotice între leguminoasă și bacterie.

Anumite mutații modificau în cazul lui *Rhizobium japonicum* sistemul de recunoaștere a leguminoasei-gazdă, în timp ce altele perturbau eficiența simbiozei, fără a afecta, totuși, genele *nif*. Astfel unele nodozități sînt ineficiente deoarece nu sintetizează leghemoglobina. Producerea acestei proteine se află sub controlul genomului plantei-gazdă, dar sinteza apoproteinei este declanșată de pătrunderea unor *Rhizobium* în rădăcinile plantei, iar sinteza grupării prostetice (hem) este efectuată de bacterii. Orice mutație care perturbează această sinteză la microorganisme antrenează carența de leghemoglobină a nodozităților care devin incolore (în loc să fie roz) și nu fixează azotul.

Concluzii

Analogia caracterelor biochimice ale proteinelor nitrogenazei la diferitele microorganisme diazotrofe arată că acizii dezoxiribonucleici care comandă sinteza lor sînt omologi; această omologie poate servi la localizarea genelor *nif* în noi microbi diazotrofi. Astfel au fost localizate pe plasmide mari genele de structură ale nitrogenazei de *Rhizobium leguminosarum* și alte sușe de *Rhizobium*; aceste gene se află în schimb pe cromozomul cianobacteriei *Anabaena* 7120, dar dispuse, se pare, într-o ordine diferită de cea indicată în fig. 7. Această omologie de structură la nivelul ADN-ului ar putea să permită și clonarea genelor *nif* de la alți microbi, după ce vor fi puse în evidență și localizate în celule. Va fi astfel înlesnită cartografierea acestor gene. În sfîrșit, din secvența nucleotidică a ADN-ului *nif* clonat va putea fi dedusă secvența polipeptidică a proteinelor nitrogenazei, după cum au făcut Sundaresan și Ausubel (1981, Postgate, 1982) pentru cazul Fe-proteinei de *Klebsiella pneumoniae*.

Progresele însemnate realizate în studiul fixării și asimilării azotului atmosferic au rezultat în mod succesiv din aplicarea tehnicilor chimiei-

fizice (structura molibdenoferoproteinei; existența probabilă a unui intermediar al fixării sub formă de hidrură de azot asociată), ale biochimiei (proteina de protecție a nitrogenazei împotriva oxigenului), și ale geneticii (clonarea tuturor genelor *nif* de *K. pneumoniae* și caracterizarea majorității produselor lor pe geluri de poliacrilamidă, cartografia genoamelor de *Rhizobium* și localizarea genelor *nif* pe plasmide naturale). Pe plan practic, mai buna cunoaștere a asociațiilor simbiotice fixatoare de azot a făcut mai eficace manipularea și utilizarea inoculanților leguminoaselor, în timp ce înțelegerea mecanismelor de reglare a nitrogenazei a ameliorat folosirea substanțelor fertilizante (îngășăminte azotate și sulfurate, molibden).

Aceste progrese, care dovedesc eficacitatea cercetării interdisciplinare, deschid de asemenea perspective promițătoare pentru aplicarea în agricultură a rezultatelor cercetărilor fundamentale așteptate în următoarele domenii: exploatarea posibilităților oferite de asociațiile fixatoare de azot formate de leguminoase tropicale și de specii de arbuști care nu aparțin leguminoaselor, precum și de rizocenozele care există între graminee și microbi diazotrofi; creșterea eficacității fixării și asimilării azotului, prin acționarea asupra mecanismelor genetice de reglare a procesului; elaborarea de noi sisteme fixatoare de azot, prin obținerea unor hibrizi somatici între cultivarii doriți și plantele fixatoare de azot, prin introducerea genelor fixării azotului (*nif*) în microorganisme simbiotice sau libere; transferul capacității fixatoare de azot la unele plante, prin utilizarea, ca vectori ai genelor *nif*, a unor virusuri sau plasmide autotransmisibile, sau prin recombinarea acestor gene cu ADN-ul mitocondrial sau cloroplastic; introducerea genelor *nif* în microbi ai rumenului și utilizarea microorganismelor diazotrofe în alimentația vitelor.

Transferul genelor **nif** la microorganisme

Elaborarea de plasmide autotransmisibile care poartă genele *nif* a permis transferarea proprietății de fixare a azotului la unele specii nefixatoare sau la unii mutanți nefixatori aparținînd unor specii diazotrofe: *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas fluorescens* și mutanți *nif* de *Azotobacter vinelandii* (Postgate, 1982).

Ușurința cu care genele *nif* puteau fi transferate în laborator între specii sau genuri de microbi duce la presupunerea că acest transfer se produce și în condiții naturale. Cercetarea repartizării diazotrofiei în cadrul speciilor și genurilor procariote studiate arată că această distribuire este aleatorie; de exemplu azotul era fixat de: 30% din sușele de *Klebsiella pneumoniae*, 20% din cele de *Erwinia herbicola*, 82% din cele de *Bacillus*, 70% din cele de *Desulfovibrio*, 58% din cele de *Pleurocapsa* și 64% din cele de *Plectonema* (Postgate, 1982). Așadar , această proprietate ar putea fi pierdută și dobîndită destul de ușor în urma schimbului de gene *nif*. O atare ipoteză ilustrează elocvent analogia de structură a proteinelor nitrogenazei extrasă din diverși microbi diazotrofici — patru Fe-proteine a căror secvență de aminoacizi a fost determinată prezentau o omologie însemnată la nivelul acestei secvențe (Scott ș.a., 1981, Postgate, 1982). Aceste proteine sînt într-adevăr mai înrudite decît citocromii și hemoglobinele care trec drept păstrătoare ale proprietăților biochimice foarte apropiate în cazul eucariotelor.

Transferul genelor *nif* în condiții naturale pare cu atît mai mult probabil cu cît el a fost realizat în laborator de toate procesele de transfer sau schimb de gene la microbi (conjugare, transducție și transformare), iar genele de structură a nitrogenazei au fost localizate pe plasmide naturale în celulele de *Rhizobium*. Schimbul de gene *nif* între o plasmidă și cromozomul bacterian, așa cum a fost realizat în laborator, s-ar putea petrece, de asemenea, în condiții naturale, ca și schimbul între sisteme simbiotice de gene care se află pe plasmide de *Rhizobium* și care determină specificitatea gazdei în aceste simbioze. Ansamblul genelor *nif* sau unii dintre operonii lor constitutivi prezintă caracterele unui transpozon.

Este așadar foarte probabil că situația actuală referitoare la repartizarea diazotrofiei este rezultatul schimbului și transferului genelor fixatoare de azot, noi specii și noi genuri microbiene diazotrofe putînd astfel să apară cînd selecția este favorabilă.

Dar trebuie observat și faptul că genele *nif* transferate nu se exprimă întotdeauna în celulele receptoare. Astfel, de exemplu, transferul genelor *nif* de *Klebsiella pneumoniae* la *Proteus mirabilis* și la *Agrobacterium tumefaciens* nu era urmat de expresia lor în cele două specii bacteriene (Postgate, 1982). Mai mult, diazotrofia este limitată la microbii de procariote și se pare că genele corespondente nu au putut trece bariera care există între acești microbi procarioți și organismele eucariote. Recombinările genetice au făcut, fără îndoială, posibilă obținerea expresiei unor gene umane (hormoni polipeptidici, interferoni) sau de la mamifere în celule de *Escherichia coli*, sau chiar expresia de gene ale unei procariote într-o celulă eucariotă, dar se pare că expresia unui ansamblu de operoni policistronici, ca, de exemplu, cel care înglobează genele *nif* de *K.pneumoniae*, în interiorul celui mai simplu genom eucariot, este foarte dificil de obținut din cauza complexității de structură și de reglare a unui asemenea ansamblu. Astfel Elmerich ș.a. (1981, Postgate, 1982) au reușit să introducă ansamblul genelor *nif* de *Klebsiella*. în celulele de *Saccharomyces cerevisiae*, sub formă de cosmidă recombinată. Aceste gene *nif* au fost conservate vreme de 50 de generații fără ca ele să se exprime la drojdii. Totuși transferul acestei cosmide la *Schizosaccharomyces pombe* putea să fie urmat cel puțin de transcripția unui operon reglator *nif LA*, activată de proteinele care intervin la această specie de levură în expresia glutamin-sintetazei și care se înrudesc cu sistemul *gln* de *Klebsiella* (Postgate și Cannon, 1981).

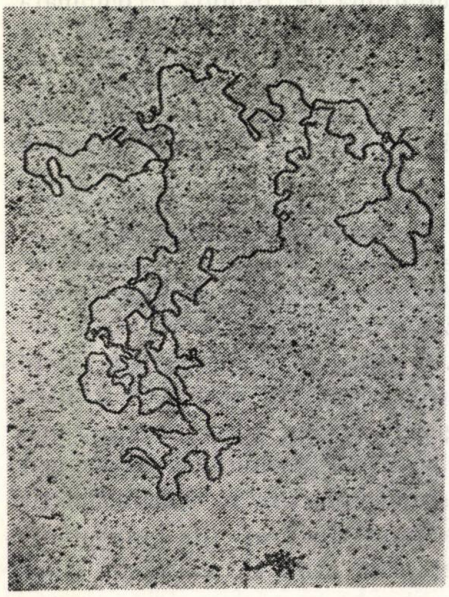
Anumite efecte nedorite ar putea să rezulte din recombinările genetice efectuate pentru transferarea genelor *nif* la noi gazde microbiene. De exemplu, transferul acestor gene la o sușă de *Erwinia* (bacterie răspunzătoare de putrezirea plantelor) ar putea spori forța ei patogenă, deoarece planta pe care o atacă este în general săracă în azot. Transferul genelor *nif* la *E. coli*, care în mod normal se găsește în intestin, ar putea să aibă consecințe interesante, dacă genele ar fi dereprimate (nitrogenaza ar fi atunci constitutivă și nu ar fi reprimată de amoniac); dar genele *nif* sînt adesea asociate unor plasmide care poartă genele de rezistență la diverse antibiotice. Aceste gene trebuie eliminate cînd se fac experiențe în scopuri practice, ca și orice material genetic dăunător care ar putea fi cotransferat din neatenție împreună cu gene *nif*. Cu toate acestea, în orice cercetare de acest tip există un raport

între riscuri și avantaje care este imposibil de evaluat cu certitudine, dar se pare că, în cazul dobîndirii de către noi organisme a capacității de a fixa azotul atmosferic, avantajele învinge inconvenientele (Postgate, 1980 b).

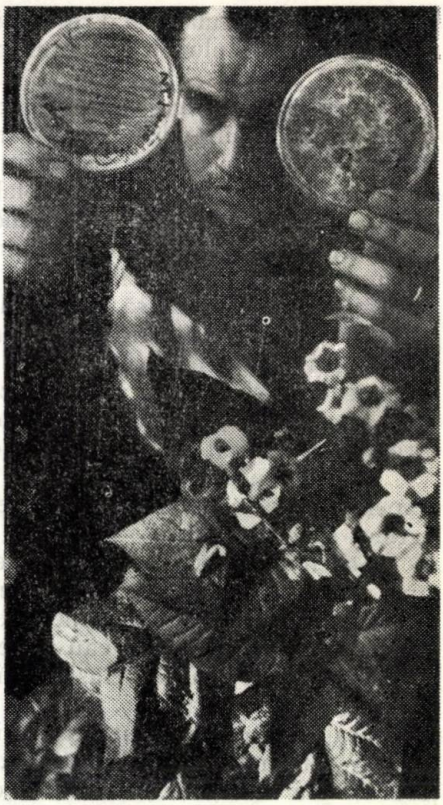
Transferul genelor **nif** și crearea de noi plante fixatoare de azot

Există posibilitatea de a concepe transferul de grupări de gene mai simple decît ansamblul *nif* și virusurile plantelor ar putea să joace aici rolul de vectori. Virusul mozaicului conopidei este un dezoxiribovirus la care este posibil să fie legate anumite gene *nif*, ce s-ar putea integra în genomul plantei sau ar putea fi transcrise în celula vegetală, în același timp cu genele virusului, cu ocazia replicării acestuia din urmă. Un alt vector posibil este bacteria patogenă *Agrobacterium tumefaciens*, care conține un plasmid mare, *Ti*, responsabil de tumorizarea țesuturilor vegetale la nivelul zonei infectate de bacterie (tumori coronariene sau crown gall; Expert ș.a., 1980).

Cercetările de genetică moleculară avînd ca obiect sușele oncogene de *Agrobacterium tumefaciens* au început în 1974, o dată cu descoperirea de către Schell și colaboratorii săi (Institutul Max-Planck de Ameliorare a Plantelor, din Köln și Universitatea de Stat din Gand) a unei plasmide în toate aceste sușe. Aceste plasmide, de 150—230 kilobaze (Zaenen ș.a., 1974), esențiale în tumorizare, au fost numite *Ti* (tumour inducing). Hamilton și Fall (1971) au constatat că o sușă bacteriană își pierdea puterea de inducție tumorală cînd era cultivată la 37°C, ca urmare a denaturării plasmidelor (Schell, 1974). Introducerea, prin transformare sau conjugare, a acestor plasmide *Ti* în sușa făcută astfel inofensivă, conferea din nou acesteia din urmă putere



Plasmida *Ti* de *Agrobacterium tumefaciens*
Microfotografie electronică a plasmidei *Ti* de *Agrobacterium tumefaciens* care induce tumorizarea țesuturilor vegetale infectate de această bacterie (tumoră coronariană a coletului sau *crown gall*). Această plasmidă a fost utilizată în experiențele de recombinare genetică în scopul transferului unor gene la plante.
[Foto: M. Kalda. In: C. M. Kinnon; A. N. Kholodilin; V. Orel (dir. publ.) *From biology to biotechnology, Progress protagonists and prospects in life science*, p. 114, Brno (Cehoslovacia), Unesco and the Mendelianum of the Moravian Museum, 1981, 153 p.]



Transferul ADN-T-ului plasmidei *Ti* de *Agrobacterium rhizogenes* la plante de tutun. ADN-T-ul (transferred ADN) este un fragment al plasmidei *Ti* de *Agrobacterium rhizogenes* care poate fi transferat la plantele infectate de această bacterie și care este apoi integrat în genomul acestora; așadar, el este transmis la descendenți, ceea ce ar permite ca el să fie utilizat pentru introducerea în plante a anumitor gene interesante, cum ar fi cele ale fixării azotului atmosferic (*nif*). În experiența reprodusă în această fotografie, ADN-T-ul conținut în cutia Pétri din stînga este transferat unei rădăcini de cultură pe mediu solid conținut în cutia din dreapta. Rădăcina dă naștere unei plante întregi al cărui genom conține ADN-T. Aceasta se reproduce pe cale sexuată pentru a da plante transformate, ale căror frunze gofrate atestă că ADN-T a fost integrat în genomul lor.
[Foto: Ph. Plailly, D. Tepfer, Laboratorul de biologie celulară, Institutul național al cercetării agronomice, Franța. În: Biofutur (Paris), nr. 5, 1982, p. 47.]

oncogenă (Chilton ș.a., 1976; Schell ș.a., 1976). Chilton (Universitatea din Washington) a observat, în 1977, că 3% din ADN-ul plasmidei Ti era prezent în mai multe cópii în ADN-ul celulelor unui țesut tumoral de tutun; el a emis atunci ipoteza integrării în genomul plantei a unui fragment din plasmida Ti, numit ADN-T (transferred ADN). Schilperrort și colaboratorii săi (Universitatea din Leyda) au arătat, în 1979, că protoplaste din celule de frunze de tutun puteau fi transformate de ADN-ul de *Agrobacterium tumefaciens* (prin utilizarea protoplastelor, acești cercetători au depășit dificultatea constituită de peretele pectocelulozic la pătrunderea ADN-ului bacterian). În 1982, ei aduceau dovada transformării constante a acestor protoplaste de către plasmida *Ti* de *Agrobacterium tumefaciens*, care era adevăratul agent al transformării tumorale (Krens, Molendijk, Wullems și Schilperoort, 1982).

ADN-ul plasmidei Ti este subdivizat în două regiuni: cea mai mare conține informația care permite bacteriei să catabolizeze derivați de aminoacizi bazici sau opine, sintetizați de celula tumorală; cealaltă regiune constituie ADN-T-ul, care este incorporat în genomul celulei vegetale. Acest ADN-T induce tumorizarea acesteia din urmă precum și transformarea metabolismului ei în scopul producerii de opine. După părerea lui Schell, ADN-T-ul avea o greutate moleculară de $10-15 \times 10^6$ daltoni și se compune din cel puțin trei unități funcționale. Secvențele nucleotidice care se află la extremitățile ADN-T-ului sînt foarte asemănătoare cu cele ale unor porțiuni de ADN al

celulei netransformate, și o recombinare între cele două tipuri ar duce la încorporarea ADN-T-ului în genomul plantei și la tumorizarea țesuturilor infectate.

Tumorizarea unui țesut vegetal de către plasmida *Ti* de *Agrobacterium tumefaciens* rezultă deci din transferul unui fragment de ADN bacterian (procariot) și din integrarea lui în genomul unei celule eucariote. Inducția sistematică de către Schell și colaboratorii săi a unor mutații în fiecare din cele șapte gene ale ADN-T-ului unei plasmide *Ti* a făcut posibilă constatarea că cinci dintre ele interveneau în tumorizarea celulară, adică în blocarea diferențierii celulelor. Cînd toate aceste cinci gene au suferit o mutație, ADN-T-ul putea încă să pătrundă în celulele de tutun, care erau cultivate pentru regenerarea plantelor întregi; dovada prezenței ADN-T-ului în acestea din urmă a fost adusă prin punerea în evidență în celula unei enzime, opin-sintaza, a cărei sinteză era comandată de o altă genă a ADN-T-ului. Descendenții rezultați din aceste plante pe cale sexuată moștenesc atît ADN-T-ul cît și proprietatea de a sintetiza opin-sintaza.

O asemenea transmitere pe linia germinală era o condiție prealabilă experiențelor de recombinare genetică ce aveau ca scop transmiterea caracterelor specifice.

Schell și colaboratorii săi au reușit să insereze în ADN-T o genă bacteriană care conferă rezistența la methotrexat și să arate că celulele în care această genă era introdusă deveneau rezistente la methotrexat. Secvențele nulceotidice care interveneau în reglarea expresiei unei gene bacteriene puteau așadar să joace același rol în celulele vegetale. Expresia altor gene inserate în plasmide *Ti* nu era, totuși, obținută în mod sistematic și mai rămînea de elucidat natura mecanismelor de expresie a genelor într-un mediu celular determinat. Pe de altă parte, cum funcția „tumorigenă" a ADN-T-ului nu era afectată cînd erau îndepărtate genele sintezei opinelor, acestea din urmă ar putea fi înlocuite cu altele, cum ar fi cele ale fixării azotului atmosferic (*nif*), pentru integrarea lor în genomul celulei-gazdă. Cu toate acestea trebuie remarcat faptul că, în măsura în care *Agrobacterium tumefaciens* infecta numai plantele dicotiledonate, nu părea ușoară introducerea plasmidelor *Ti* în celulele de plante monocotiledonate ca, de exemplu, cerealele, în scopul transferării genelor specifice.

În afara dificultăților proprii transferului genelor *nif* în celulele unei plante eucariote, utilizînd de exemplu, ca vector ADN-T-ul plasmidei *Ti* de *Agrobacterium tumefaciens*, reglarea expresiei acestor gene *nif* ridică și alte probleme. Nitrogenaza trebuie protejată în special împotriva acțiunii inhibitoare a oxigenului.

Tehnicile de recombinare și de clonare a acizilor nucleici au făcut posibilă transferarea genelor în celule vegetale și obținerea expresiei lor în acestea. În iunie 1981 s-a făcut cunoscută reușita unei experiențe realizată de Kemp (Agrigenetics Corporation, Madison în statul Wisconsin)și Hall (Universitatea din Madison, Wisconsin, care au transferat unor plante de floarea-soarelui gena unei proteine de fasole, faseolina. Acest transfer era urmat de sinteza ARN-ului mesager al acestei proteine de rezervă în celulele de floarea-soarelui, devenite tumorale prin acțiunea ADN-T-ului de *Agrobacterium tumefaciens* care a servit genei drept vector. Dar proteina nu era sintetizată și nu au putut fi obținute plante întregi pornind de la celule tumorale. O altă echipă americană a reușit să încorporeze în genomul celulelor de floarea-soarelui gena pro-

teinei de rezervă a porumbului, ca şi cea a unei enzime a drojdiei, alcool-dehidrogenaza. Prin utilizarea unor specii vegetale la care este mai uşor de obţinut regenerarea pornind de la celule în cultură *in vitro* sau de la calusuri şi prin modificarea ADN-T-ului, ar fi posibil să se ajungă la expresia completă a genelor transferate la aceste specii, şi mai ales s-ar cunoaşte mai bine mecanismele acestei expresii. Toate acestea au fost trecute în revistă în cursul unui colocviu organizat, în perioada 16—19 mai 1982 la Beltsville (Maryland), la Centrul de Cercetare Agronomică al Departamentului American al Agriculturii, şi avînd ca obiect aplicaţiile ingineriei genetice în agricultură.

ADN-ul anumitor gene *nif* ar putea fi clonat prin aceleaşi tehnici şi apoi transferat. O micoriză endotrofă ar putea primi gene *nif*, un astfel de transfer părînd mai uşor de realizat în cazul ciupercilor decît în cel al plantelor vegetale superioare.

Dar, oricare ar fi tehnicile folosite pentru transferul genelor *nif*, expresia finală a acestora, adică transcripţia lor în ARN-mesager şi translaţia acestuia în proteine, trebuie să poată fi asigurată în celula vegetală. Mecanismele în cauză nu sînt identice la cele două tipuri de organisme. Localizarea finală a acestor gene determină tipul secvenţelor de reglare necesare expresiei lor. O localizare cromozomică ar necesita fuziunea fiecărei gene *nif* esenţială unui promotor eucariot (în acest scop ar fi util un promotor al regiunii ADN-T-ului plasmidei *Ti* de *Agrobacterium tumefaciens*).

În schimb o localizare în cloroplaste a genelor *nif* ar necesita o manipulare genetică mai puţin complexă, deoarece modul de expresie al genelor de cloroplaste pare compatibil cu cel al genelor de la procariote; ARN-polimeraza cloroplastului ar putea iniţia transcripţia promotorilor *nif* în prezenţa produsului (inductor) genei *nif* A (Postgate şi Cannon, 1981).

În afara acestor dificultăţi de natură genetică, există şi altele în cazul transferului genelor *nif*. Dobîndirea de către o plantă a capacităţii de a fixa azotul atmosferic necesită, într-adevăr, nu numai prezenţa tuturor genelor *nif*, ci şi a celor care comandă sinteza transportorilor de electroni şi a cofactorilor necesari funcţionării nitrogenazei; protejarea nitrogenazei împotriva acţiunii inhibitoare a oxigenului trebuie să fie asigurată şi în noul mediu, mai mult sau mai puţin aerob, în care va funcţiona (Stewart; 1975; Postgate, 1977, 1980 b, 1982).

Dacă crearea de plante capabile să fixeze azotul atmosferic independent de microbii simbiotici rămîne, la nivelul actual al cercetărilor, o întreprindere dificilă şi complexă, este, în schimb, pe de-a-ntregul posibil să fie mai bine cunoscuţi factorii care se află la originea simbiozelor fixatoare de azot, în scopul ameliorării eficacităţii lor. Suşe de *Rhizobium* selecţionate genetic (posedînd, de exemplu, o hidrogenază care reciclează hidrogenul în mod eficace), apoi ameliorate şi mai mult pe plan genetic, vor putea constitui inoculanţi mai eficace şi leguminoaselor cultivate. Cercetările de genetică vegetală vor contribui şi ele la selecţionarea unor plante-gazdă mai eficace (hibridarea somatică va permite izolarea unor noi soiuri de plante care fixează azotul în mod simbiotic). Pe de altă parte, microorganismele care formează rizocenozele cu alte plante decît leguminoasele (cerealele, de exemplu) ar putea fi modificate la nivelul genomului lor pentru ca aceste asocieri să devină şi mai eficace.

Concluzii

Lucrările de cercetare fundamentală destinate obținerii transferului și expresiei genelor fixatoare de azot în celulele unor plante superioare vor duce, după toate aparențele, la descoperiri promițătoare. În acest caz vor fi indispensabile alte cercetări și teste înainte de a se proiecta aplicații interesante pe plan agricol. Hardy (1976) a considerat, într-adevăr, că este necesară o durată minimă de zece ani pentru a putea fi aplicată, în plan agronomic, o descoperire teoretică (de exemplu, extinderea simbiozei fixatoare de azot la cereale). Dacă în laborator ar fi obținută o cereală fixatoare de azot, ar fi nevoie de mai mulți ani pentru teste și verificări înainte de a o cultiva în mod obișnuit și de a o răspîndi; durata ar fi de 10—20 de ani.

Oricum ar fi, acestor lucrări li se acordă o importanță din ce în ce mai mare. Departamentul american al agriculturii, de exemplu, dă prioritate de prim rang cercetărilor asupra fixării biologice a azotului atmosferic care sînt de natură să producă o sporire a productivității plantelor: în 1980, alocațiile de cercetare în acest domeniu reprezentau 25% din ansamblul subvențiilor acordate lucrărilor de biologie vegetală.

Producerea de substanţe utile cu ajutorul microorganismelor. Microbiologie industrială

Avantajul şi varietatea producţiilor microbiene

După studiile lui Pasteur asupra fermentaţiilor alcoolică, butirică şi lactică, descoperirea de către Weizmann, în timpul primului război mondial, a fermentaţiei acetono-butanolice a marcat o etapă importantă în microbiologia industrială. Cu sinteza penicilinelor prin fermentaţie realizată în anii '40 se deschidea era microbiologiei industriale moderne. Compuşii produşi de microorganisme sînt următorii (după Demain, 1981; v. şi tabelul 9, şi Sasson, 1970):

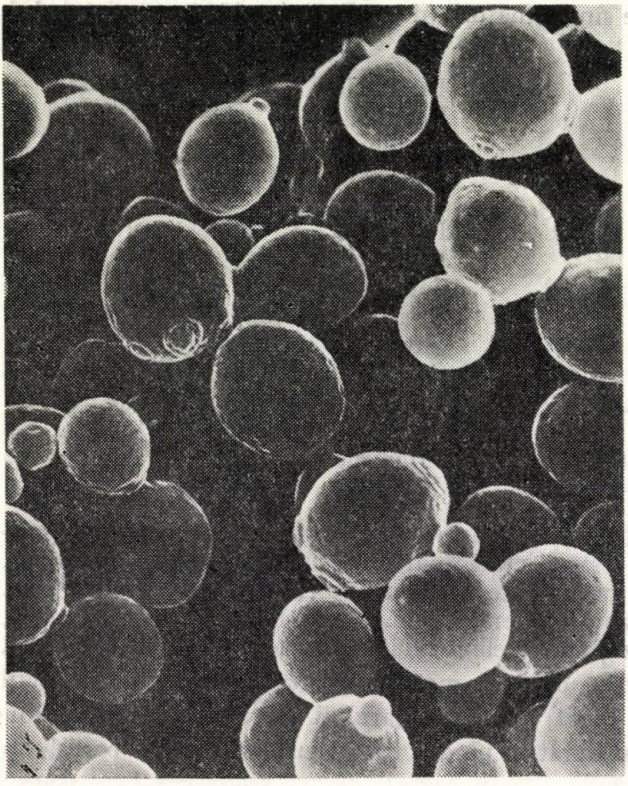
Aminoacizi
Acizi nucleici
Acizi organici
Acidulanţi
Alcaloizi
Antibiotice
Antimetaboliţi
Antioxidanţi
Coenzime
Compuşi antihelmintici
Enzime
Factori de transfer ai fierului
Erbicide
Hormoni de creşterea plantelor
Inhibitori enzimatici
Insecticide
Ionofori
Lipide
Nucleozide şi nucleotide
Pigmenţi
Poliozide
Proteine
Solvenţi
Steroil şi steroizi modificaţi
Substanţe antitumorale
Substanţe emulsifiante
Substanţe farmacodinamice
Substanţe tensioactive
Vitamine

Alegerea sintezei chimice sau a biosintezei pentru producerea unei substanţe folosită în industrie este dictată mai ales de considerente de natură economică. Costul materiei prime este, în această privinţă, foarte important. În cazul fermentaţiei, această materie primă o constituie, cel mai adesea, un poliozid (amidon, celuloză) sau unele reziduuri din industria agroalimentară (melase, zer etc.). În sinteza chimică materia primă o constituie petrolul sau derivaţii lui. Trebuie luată în considerare şi eficacitatea procesului: proporţia substratului transformat în produs final, durata sintezei, costul de

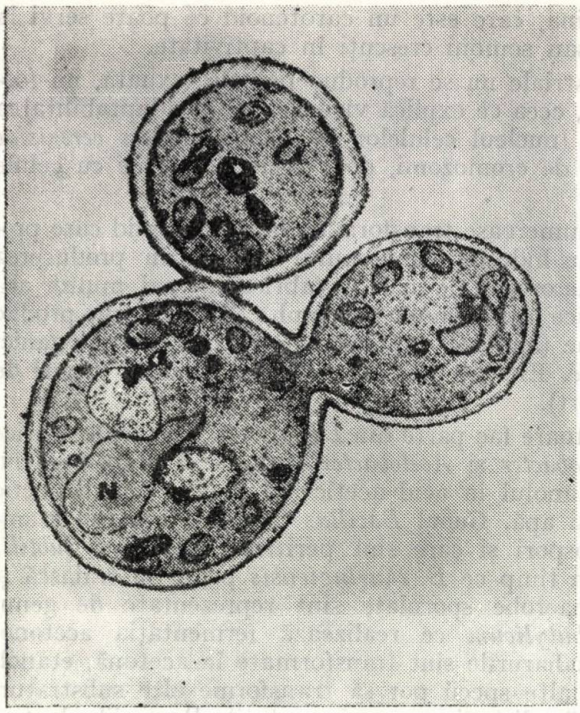
recuperare al produsului pornind de la mediul de fermentație sau de la reactivii de sinteză artificială. Trebuie, de asemenea, să se țină seamă de costul eliminării reziduurilor sau deșeurilor din procesul de fabricație, precum și de utilizarea ulterioară a acestora din urmă.

Microorganismele care sintetizează produse sau care efectuează reacții utile pentru om sînt în număr de cîteva sute de specii din cele peste 100 000 cîte se cunosc în natură. Aceste specii microbiene se împart în patru grupe: bacteriile, actinomicetele (bacterii filamentoase care trăiesc în sol), levurile și mucegaiurile.

Dintre cele cinci sute de specii de levuri cunoscute, cea mai veche în serviciul omului și cea mai intens cultivată este *Saccharomyces cerevisiae*; sînt, într-adevăr, utilizate numeroase sușe de drojdie de bere pentru fabricarea vinului, a berii, a sake-ului, a băuturilor alcoolice și pentru fabricarea pîinii. *Kluyveromyces fragilis* este o drojdie care fermentează lactoza și care servește la producerea alcoolului pornind de la zer. *Saccharomycopsis lipolytica* degradează hidrocarburile și servește la fabricarea biomasei protidice. Aceste trei specii aparțin clasei *Ascomicetelor*. Alte specii utile sînt cuprinse în clasa *Deuteromicetelor* deoarece ele se reproduc numai prin înmugurire și nu au mod de reproducere sexuat. *Candida utilis* crește pe licori sulfitate (deșeuri din industria pastei de hîrtie); *Trichosporon cutaneum* oxidează numeroși compuși organici, dintre care anumiți compuși toxici cum sînt fenolii, și joacă un rol important în sistemele de epurare pe cale aerobă; *Phaffia rho-*



Celule de drojdie de bere, *Saccharomyces cerevisiae*.
Microfotografie luată la microscopul cu baleiaj. Celulele au un diametru de aproximativ 5 micrometri și cele mai multe sînt pe cale de a se divide prin înmugurire, în timp ce altele au cicatrice circulare corespunzătoare mugurilor care s-au detașat de celula-mamă.
[Foto: A. T. Pringle, Department of Microbiology, University of California, Los Angeles, S.U.A. În: Scientific American (New York), vol. 245, nr. 3, 1981, p. 96.]



Microfotografie electronică a unei celule de drojdie. *(Saccharomyces cerevisiae)* care se înmulțește prin înmugurire.

Celula principală a dat naștere unui prim mugure care aderă încă la peretele celular, în timp ce un alt mugure este în curs de formare. Se disting atît în muguri ca și în celula-mamă mitocondrii care pot fi recunoscute datorită invaginărilor membranare caracteristice. Nucleul (*N*) se vede bine în celula-mamă; el este delimitat printr-o membrană, deoarece este vorba de un microorganism eucariot.

× 10 000

[Foto: B. Stevens, Centrul de cercetare de biochimie și de genetică celulară din Centrul național al cercetării științifice (CNRS), Toulouse, Franța.]

Structura ADN-ului mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*. ADN-ul din mitocondriile celulelor de drojdie de bere se prezintă sub forma mai multor molecule circulare, bicatenare.

× 82 000

[Foto: P. Slonimski, Centrul de genetică moleculară din Centrul național al cercetării științifice, Gif-sur-Yvette, Franța.]

dozyma sintetizează astaxantina, care este un carotenoid ce poate servi la colorarea cărnii de păstrăvi sau somoni crescuți în captivitate.

În general, levurile industriale nu se reproduc pe cale sexuată, nu formează spori și sînt poliploide, ceea ce explică vigoarea lor și adaptabilitatea lor la schimbările din mediu (nucleul celulelor de *Saccharomyces cerevisiae* conține, după caz, 27 sau 34 de cromozomi, deci avem de-a face cu celule haploide sau diploide).

Mucegaiurile efectuează numeroase transformări în mediu solid care precedă fermentațiile, de exemplu hidroliza amidonului din orez în producerea sake-ului sau a celei de soia de orez și de malț în fabricarea mai multor alimente consumate în țări asiatice (miso, shoyu și temph). Mucegaiurile produc și enzime utilizate în industrie (amilaze, proteaze, pectinaze), acizi organici (acid citric, lactic), antibiotice. Ele intervin și în fabricarea unor tipuri de brînză (camembert și roquefort).

Speciile de bacterii folositoare fac parte din *Eubacterii*. Bacteriile acetice reprezentate de genul *Gluconobacter* și *Acetobacter* sînt bacili gram-negativi care transformă — primul: etanolul în acid acetic; al doilea: acidul acetic produs în dioxid de carbon și apă. Genul *Bacillus* cuprinde bacterii gram-pozitive, care formează endospori și care sînt peritrihe. *Bacillus subtilis* este o specie strict aerobă, în timp ce *B. thuringiensis* poate să trăiască și în anaerobioză. Bacteriile anaerobe sporulate sînt reprezentate de genul *Clostridum*, specia *C. acetobutylicum* ce realizează fermentația acetono-butanolică, în cursul căreia zaharurile sînt transformate în acetonă, etanol, izopropanol și *n*-butanol; și alte specii pot să transforme alte substraturi fermentabile (amidon, pectină, diverși compuși azotați). Bacteriile lactice cuprind mai multe specii din genurile *Lactobacillus*, *Leuconostoc* și *Streptococcus*, care nu formează spori; sînt gram-pozitivi și pot tolera prezența oxigenului. Bacteriile lactice heterofermentative din genul *Leuconostoc* transformă zaharurile în acid lactic, în etanol și în dioxid de carbon; bacteriile homofermentative din genul *Streptococcus* produc numai acid lactic, în timp ce fermentația efectuată de speciile din genul *Lactobacillus* dă și mulți alți compuși în afara acidului lactic. Bacteriile din genul *Corynebacterium*, ale căror celule imobile, gram-pozitive, nu formează endospori, cuprind specii patogene (*C. diphteriae*, *C. tuberculosis*) precum și specii nepatogene, care trăiesc în sol și prezintă interes pentru industrie. *C. glutamicum* produce lizina și 5'-nucleotide, utilizate drept condimente. Corinebacteriile sînt bacterii anaerobe facultative, dar dezvoltarea lor este optimă în aerobioză. Ele sintetizează o catalază care descompune apa oxigenată în oxigen și apă.

Actinomicetele propriu-zise sînt bacterii strict aerobe, gram-pozitive, care nu formează spori. Genul cel mai important din această grupă este genul *Streptomyces*, din care mai multe specii produc antibiotice folosite pe scară largă. Cultivate pe mediu solid, actinomicetele formează un miceliu foarte fin, din care pleacă hife aeriene care se diferențiază în lanțuri de conidiospori. Fiecare conidiospor poate da naștere unei microcolonii. Un alt gen de actinomicet, *Micromonospora*, ale cărei colonii nu formează hife aeriene ci nonidiospori direct pe miceliu, produce, de asemenea, antibiotice.

Produșii fermentațiilor și ai metabolismului microbieni pot fi metaboliți primari, metaboliți secundari, enzime, poliozide capsulare precum și biomasa celulară însăși (este vorba, așadar, de proteine ale organismelor unicelulare)·

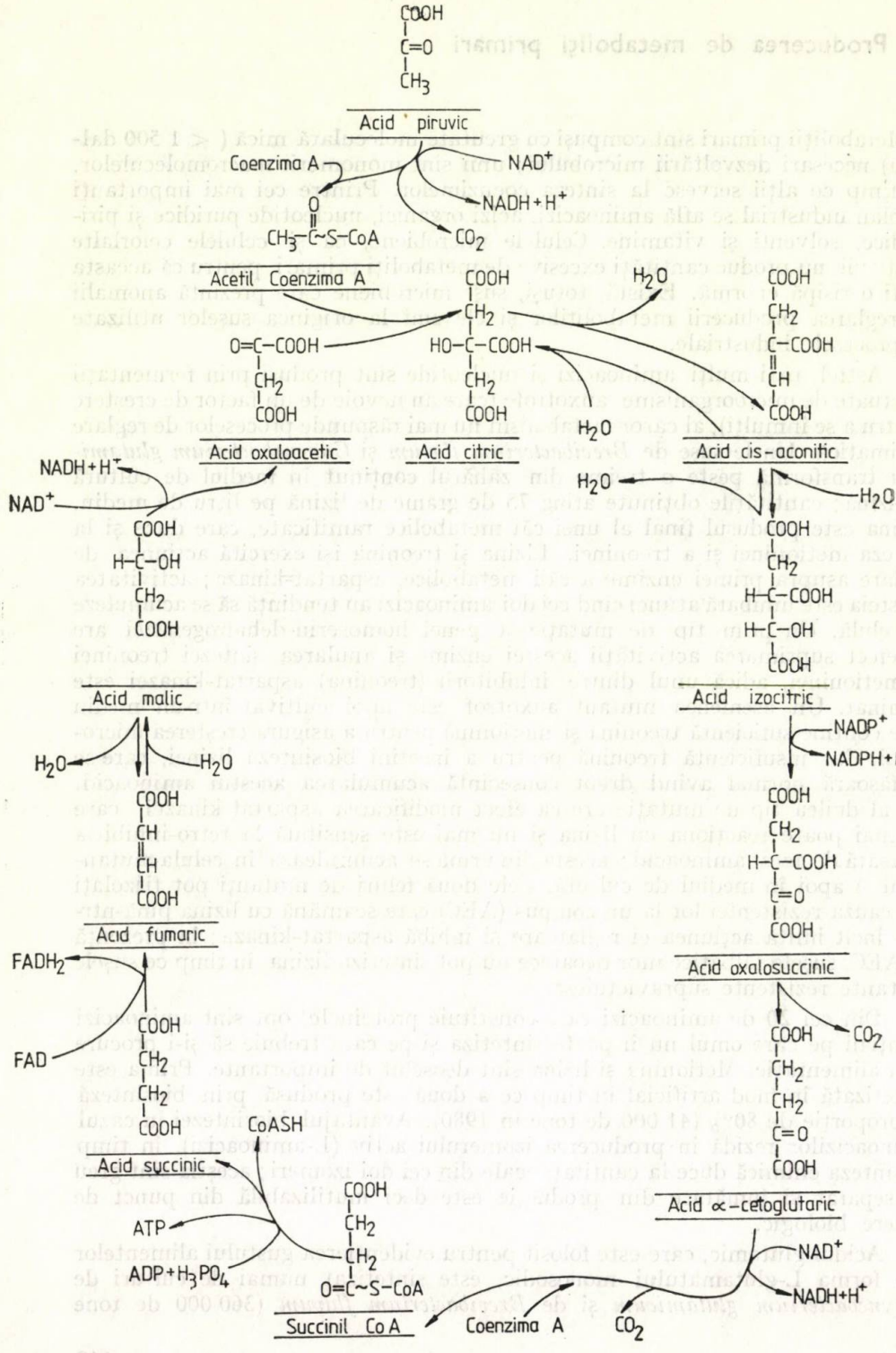
Producerea de metaboliți primari

Metaboliții primari sînt compuși cu greutate moleculară mică (< 1 500 daltoni) necesari dezvoltării microbului; unii sînt monomerii macromoleculelor, în timp ce alții servesc la sinteza coenzimelor. Printre cei mai importanți în plan industrial se află aminoacizi, acizi organici, nucleotide puridice și pirimidice, solvenți și vitamine. Celulele microbiene, ca și celulele celorlalte ființe vii, nu produc cantități excesive de metaboliți primari, pentru că aceasta ar fi o risipă enormă. Există, totuși, sușe microbiene care prezintă anomalii în reglarea producerii metaboliților și ele sînt la originea sușelor utilizate în procesele industriale.

Astfel, mai mulți aminoacizi și nucleotide sînt produși prin fermentații efectuate de microorganisme auxotrofe (care au nevoie de un factor de creștere pentru a se înmulți), al căror metabolism nu mai răspunde proceselor de reglare enzimatică. Unele sușe de *Brevibacterium flavum* și *Corynebacterium glutamicum* transformă peste o treime din zahărul conținut în mediul de cultură în lizină; cantitățile obținute ating 75 de grame de lizină pe litru de mediu. Lizina este produsul final al unei căi metabolice ramificate, care duce și la sinteza metioninei și a treoninei. Lizina și treonina își exercită acțiunea de reglare asupra primei enzime a căii metabolice, aspartat-kinaza; activitatea acesteia este inhibată atunci cînd cei doi aminoacizi au tendință să se acumuleze în celulă. Un prim tip de mutație a genei homoserin-dehidrogenazei are ca efect suprimarea activității acestei enzime și anularea sintezei treoninei și metioninei, adică unul dintre inhibitorii (treonina) aspartat-kinazei este eliminat. Un asemenea mutant auxotrof este apoi cultivat într-un mediu care conține suficientă treonină și metionină pentru a asigura creșterea microbului, dar insuficientă treonină pentru a încetini biosinteza lizinei, care se desfășoară normal avînd drept consecință acumularea acestui aminoacid. Un al doilea tip de mutație are ca efect modificarea aspartat-kinazei, care nu mai poate reacționa cu lizina și nu mai este sensibilă la retro-inhibiția exersată de acest aminoacid; acesta din urmă se acumulează în celula mutantului și apoi în mediul de cultură. Cele două feluri de mutanți pot fi izolați din cauza rezistenței lor la un compus (AEC) care seamănă cu lizina pînă-ntr-atît încît imită acțiunea ei reglatoare și inhibă aspartat-kinaza; în prezență de AEC, sușele sălbatice mor deoarece nu pot sintetiza lizina, în timp ce sușele mutante rezistente supraviețuiesc.

Din cei 20 de aminoacizi care constituie proteinele, opt sînt aminoacizi esențiali pe care omul nu îi poate sintetiza și pe care trebuie să și-i procure prin alimentație. Metionina și lizina sînt deosebit de importante. Prima este sintetizată în mod artificial în timp ce a doua este produsă prin biosinteză în proporție de 80% (41 000 de tone în 1980). Avantajul biosintezei în cazul aminoacizilor rezidă în producerea izomerului activ (L-aminoacizi), în timp ce sinteza chimică duce la cantități egale din cei doi izomeri; aceștia sînt greu de separat și jumătate din producție este deci inutilizabilă din punct de vedere biologic.

Acidul glutamic, care este folosit pentru evidențierea gustului alimentelor sub forma L-glutamatului monosodic, este sintetizat numai de culturi de *Corynebacterium glutamicum* și de *Brevibacterium flavum* (360 000 de tone


Acid piruvic
Coenzima A
NAD+
NADH+H+
CO2
Acetil Coenzima A
H2O
Acid oxaloacetic
Acid citric
Acid cis-aconitic
NADH+H+
NAD+
Acid malic
Acid izocitric
NADP+
NADPH+H+
Acid fumaric
Acid oxalosuccinic
FADH2
FAD
CoASH
Acid succinic
ATP
ADP+H3PO4
Acid ∝-cetoglutaric
Succinil Co A
Coenzima A
CO2

în 1980). În S.U.A., în 1980, erau consumate 30 000 de tone de către industria alimentară și o treime din această cantitate era importată din Coreea de Sud și Japonia, a căror producție era de 100 000 de tone pentru glutamat (ajinomoto) și de 20 000 de tone pentru lizină (în Scientific American, 1981). Substratul acestei fermentații îl constituie glucoza, dar au fost folosite *n*-parafine la sfîrșitul anilor '60, cînd acestea erau din abundență și ieftine; acidul acetic, și el un bun substrat, dă mai puține reziduuri decît glucoza.

Prin cultivarea de *Corynebacterium glutamicum* într-un mediu a cărei concentrație de biotină se află sub limita optimă, sinteza fosfolipidelor membranare este deficientă iar glutamatul de sodiu poate traversa membrana celulară mai ușor și se poate acumula în mediu. Adăugarea de penicilină la acesta din urmă dă un rezultat analog, deoarece antibioticul inhibă sinteza peretelui celular și înlesnește, așadar, exsorbția aminoacidului.

Se preconizează dezvoltarea producției industriale a aminoacizilor, în special a lizinei și metioninei, atît în scopul alimentației omului cît și pentru suplimentarea rațiilor alimentare ale animalelor domestice. Astfel, compania Eurolysine din Amiens (Franța) a investit 27 de milioane de dolari pentru a obține o producție dublă de lizină (în Scientific American, 1981). Și cererea de glicocol, de alanină și de cisteină a crescut, deoarece primii doi aminoacizi erau utilizați pentru aromatizarea alimentelor, iar al treilea pentru ameliorarea texturii pîinii. Folosirea aminoacizilor în tratarea anumitor afecțiuni gastrice și hepatice a contribuit, de asemenea, la creșterea acestei cereri.

Acidul acetic este acidul organic cel mai important pe plan industrial; el servește la fabricarea cauciucului, a materialelor plastice, a fibrelor de acetat, a substanțelor farmaceutice, a insecticidelor etc. În Japonia acidul acetic constituie substratul fermentațiilor care produc aminoacizii. În 1980, producția de acetat în S.U.A. depășea 1 400 000 de tone (cu excepția oțetului), avînd o valoare de 500 milioane de dolari (în Scientific American, 1981) Reducerea etanolului la acid acetic de către bacteriile acetice nu este rentabilă decît în cazul fabricării oțetului; sinteza chimică constă în carbonilarea metanolului. Se fac cercetări asupra fermentației celulozei în acid acetic cu ajutorul unei bacterii termofile, în timp ce *Clostridium aceticum* și *Acetobacter woodii* sînt capabile să transforme dioxidul de carbon și hidrogenul în acid acetic. Dar dezvoltarea unui asemenea procedeu de fabricație depinde de studiul aprofundat al acestor specii bacteriene.

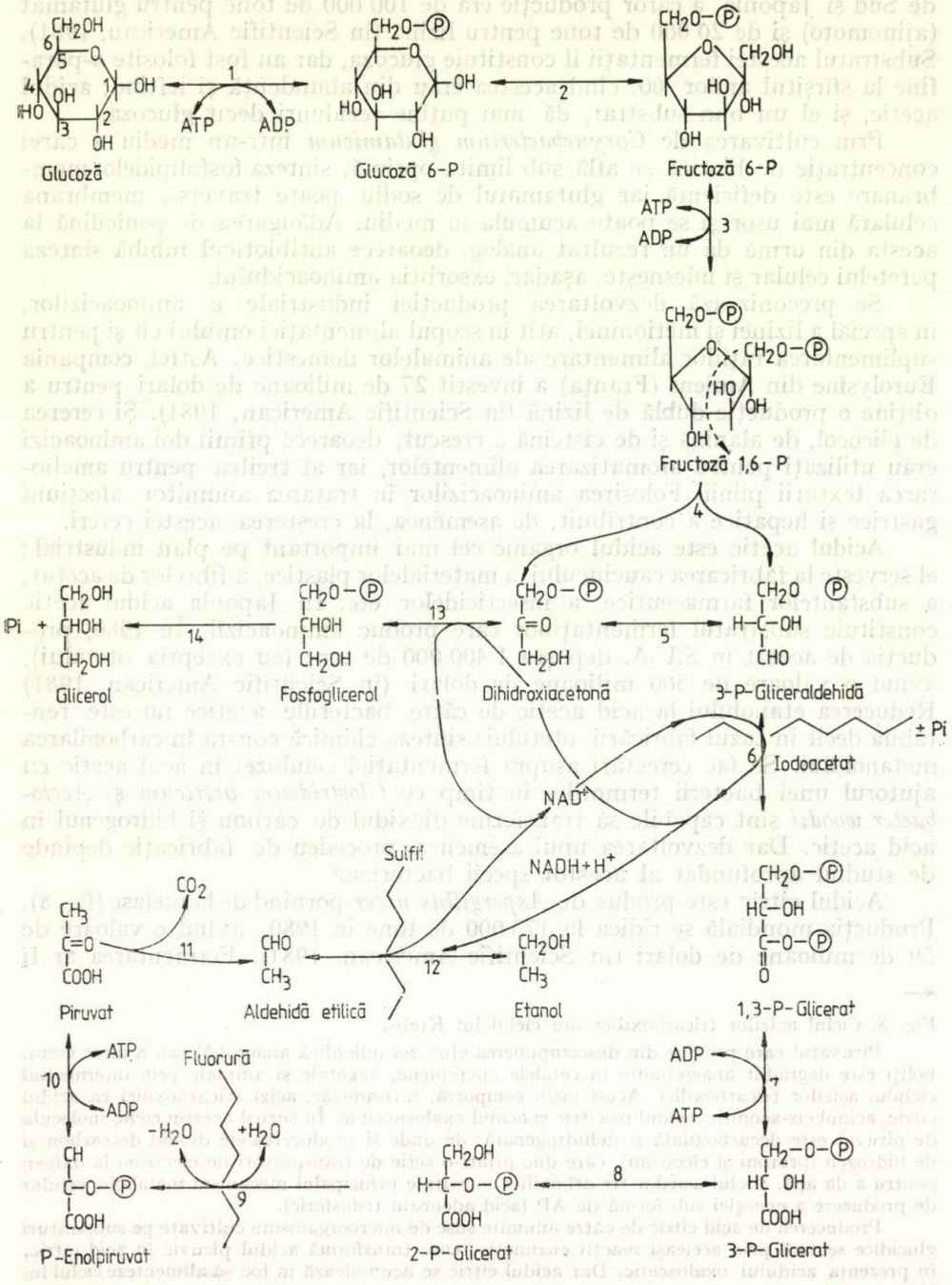
Acidul citric este produs de *Aspergillus niger* pornind de la melase (fig. 8). Producția mondială se ridica la 175 000 de tone în 1980, avînd o valoare de 59 de milioane de dolari (în Scientific American, 1981). Fermentarea ar fi

←

Fig. 8. Ciclul acizilor tricarboxilici sau ciclul lui Krebs.

Piruvatul care provine din descompunerea glucozei (glicoliză anaerobă) sau a altor metaboliți este degradat anaerobiotic în celulele microbiene, vegetale și animale prin intermediul ciclului acizilor tricarboxilici. Acest ciclu comportă, într-adevăr, acizi tricarboxilici ca acidul citric, acidul cis-aconitic, acidul izocitric și acidul oxalosuccinic. În cursul acestui ciclu, molecula de piruvat este decarboxilată și dehidrogenată: de unde și producerea de dioxid de carbon și de hidrogen (protoni și electroni), care duc printr-o serie de transportori de electroni la oxigen pentru a da apă. Ciclul acizilor tricarboxilici constituie principalul mecanism metabolic celular de producere a energiei sub formă de AP (acid adenozin trifosforic).

Producerea de acid citric de către anumite sușe de microorganisme cultivate pe substraturi glucidice se face prin aceleași reacții enzimatice care transformă acidul piruvic în acid citric, în prezența acidului oxaloacetic. Dar acidul citric se acumulează în loc să alimenteze ciclul lui Krebs.


Glucoză
Glucoză 6-P
Fructoză 6-P
Fructoză 1,6 - P
Glicerol
Fosfoglicerol
Dihidroxiacetonă
3-P-Gliceraldehidă
Iodoacetat
Piruvat
Aldehidă etilică
Etanol
1,3-P-Glicerat
P-Enolpiruvat
2-P-Glicerat
3-P-Glicerat
ATP
ADP
Fluorură
Sulfit
NAD+
NADH+H+
± Pi

mai economică dacă substratul ar fi celuloza; aceasta ar putea fi degradată de suşele de *A. niger* cărora le-ar fi transferate genele celulazelor.

Acidul lactic, utilizat ca acidulant în industria alimentară şi drept corosiv în industria textilă, care serveşte şi în electrolustruirea şi fabricarea maselor plastice, a fost primul acid organic produs prin fermentaţie. În S.U.A. şi în Europa, producţia anuală era de 40 000 de tone în 1980, avînd o valoare de 56 de milioane de dolari (în Scientific American, 1981). În S.U.A. cvasitotalitatea acidului lactic se fabrică prin sinteză chimică, în timp ce, în Europa, jumătate se fabrică prin fermentarea glucozei cu ajutorul lui *Lactobacillus delbrueckii*.

Lipsa anumitor elemente este o condiţie esenţială a desfăşurării cîtorva fermentaţii: de exemplu, producerea acidului citric de către *Aspergillus niger* în absenţă de fier şi magan, sau producerea acidului fumaric cu ajutorul lui *Rhizopus nigricans* în absenţa zincului.

Acţionînd asupra reglării metabolice şi efectuînd modificările genetice corespunzătoare, se poate obţine un surplus însemnat de producţie a anumitor vitamine: *Ashbya gossyppii* poate sintetiza de 20 000 de ori mai multă riboflavină decît îi este necesară pentru creştere, în timp ce *Pseudomonas denitrificans* poate produce de 50 000 de ori mai multă vitamina B_{12}.

Fabricarea băuturilor fermentate de diverse suşe de microorganisme se bazează pe fermentaţia alcoolică, aceea care transformă zaharurile fermentabile conţinute în substratul iniţial (amidon sau suc de fructe) în etanol şi în alte produse mai puţin abundente. Acest tip de fermentaţie care duce la producerea unui metabolit primar poate fi orientată nu către fabricarea unei băuturi alcoolizate, ci către producerea masivă de alcool etilic, care serveşte ca materie primă în industrie sau drept carburant. Se întîmplă la fel şi cu alţi alcooli, ca glicerolul, care poate fi produs printr-o variantă a fermentaţiei alcoolice (fig.9), sau *n*-butanolul, la care duce fermentaţia acetono-butanolică.

Cercetările arheologice au arătat că fermentaţia extractelor din boabe de cereale se constituia într-un meşteşug desăvîrşit încă acum 6 000 de ani; fabricarea vinului datează de aproape 5 000 de ani.

Berea se fabrică din orz încolţit sau malţ (la care se adaugă alte cîteva cereale ca meiul sau sorgul). Malţificarea are ca efect inducerea în boabe a producerii enzimelor care, în timpul sau după malţificare, catalizează hidroliza amidonului. Malţul este după aceea zdrobit şi amestecat cu apă la o temperatură care poate atinge 67°C; în cîteva ore se produce o hidroliză a lanţurilor de amidon precum şi o proteoliză parţială. Extractul apos sau mustul de malţ este fiert cu hameiul, ceea ce are ca efect oprirea activităţii enzimatice, precipitarea proteinelor prezente şi extragerea substanţelor aromatice din

←

Fig. 9. Degradarea glucozei în anaerobioză (glicoliza anaerobă) şi fermentaţia alcoolică. Molecula de glucoză este degradată în două molecule de trioze-fosfaţi (3-fosfogliceraldehida), apoi în două molecule de piruvat în glicoliză anaerboă. Drojdia transformă, apoi, piruvatul în aldehidă etilică, care este redusă la etanol în procesul de fermentaţie, adică în anaerobioză. În cursul acestui proces se formează şi mici cantităţi de glicerol care provine din reducerea unuia din trioze-fosfaţi (dihidroxiacetona).

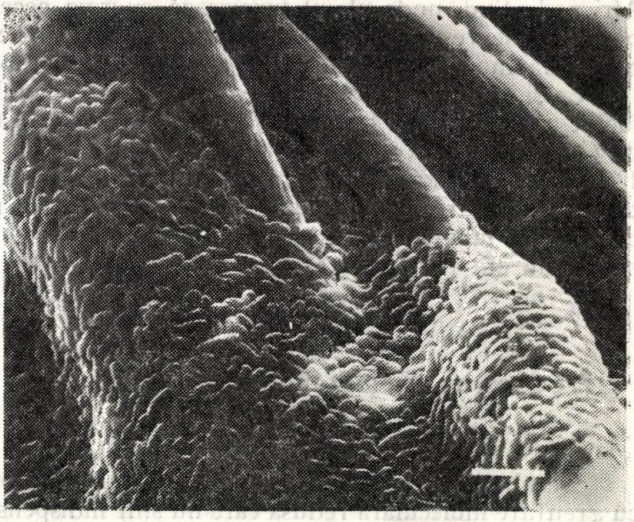
Enzimele care catalizează diferitele reacţii sînt glucokinaza (*1*), fosfohexoz-izomeraza (*2*), fructoza 6-fosfat-kinaza (*3*), aldolaza (*4*), trioza fosfat-izomeraza (*5*), trioza fosfat dehidrogeneza (*6*), transfosforilaza (*7*), fosfogliceromutaza (*8*), enolaza (*9*), piruvat kinaza (*10*), carboxilaza (*11*), etanol dehidrogenaza (*12*), glicerol fosfat dehidrogenaza (*13*) şi fosfataza (*14*).

hamei. Mustul este apoi însămînțat cu o suşă de *S.cerevisiae*, care fermentează zaharurile în alcool şi dioxid de carbon (biomasa drojdiei este de asemenea sporită de cinci ori în cursul fermentației). Sînt produşi şi alți compuşi în cantități foarte reduse şi ei dau berii aroma ei specifică: alcooli amilic, izoamilic şi fenil-etilic (a cărui concentrație este de ordinul a cîtorva miligrame pe litru), acizii acetic şi butiric, şi esterii lor. La sfîrşitul fermentației, drojdia este separată de bere, care este filtrată şi pasteurizată după o perioadă de maturare. Majoritatea tipurilor de bere sînt „lagers", provenind din fermentația drojdiilor inferioare, care se sedimentează pe fundul căzilor de fermentare; aceste drojdii au fost izolate în cultură pură către anul 1880 de către botanistul danez Hansen, care lucra la Institutul Carlsberg din Copenhaga (*Saccharomyces carlsbergensis*). Drojdiile superioare, care nu se sedimentează în cursul fermentației, aparțin speciei *S. cerevisiae* şi dau tipuri de bere mai alcoolizate. Producția mondială anuală de bere era, în 1980, în jur de 700 000 000 de hectolitri.

Vinificarea rămîne în continuare în multe regiuni viticole un procedeu artizanal, în care iscusința tradițională se unește cu practicile agricole pentru a da un vin cu calități deosebite (vin țărănesc/de pivniță). Modernizarea fermentației alcoolice a constat mai ales în selecționarea unor suşe performante de *S. cerevisiae*, care servesc la însămînțarea mustului provenit din sucul de strugure, în reglarea temperaturii de fermentație între 7 şi 14°C şi, pentru fabricarea vinurilor de calitate medie, în realizarea unei fermentații continue.

Fabricarea sake-ului sau vinului de orez (27 de milioane de hectolitri pe an în Japonia, în 1980) este mai aproape de cea a berii decît de a vinului, deoarece substanța glucidică este în acest caz tot amidonul. Acesta din urmă este transformat în zaharuri fermentabile de *Aspergillus oryzae*, ai cărui spori sînt amestecați cu orezul decorticat şi însămînțat cu o suşă de *S. cerevisiae* (moto); fermentația durează pînă la trei săptămîni. Tehnologia de producere a saké-ului este complexă şi greu de urmărit deoarece ea necesită stăpînirea unor tehnici diferite de fermentație (semisolidă şi în apă) şi supravegherea populațiilor succesive de microorganisme: mucegaiuri (*Aspergillus oryzae*), bacterii (*Lactobacillus* şi *Leuconostoc spp*) şi drojdie (*Saccharomyces cerevisiae*). Gradul de alcool, ajustat la 16% (din volum) pentru comercializare, poate atinge 20% la sfîrşitul fermentației. Toleranța suşelor de drojdie la o asemenea concentrație de alcool se datorează caracterului heterogen al fermentației. Selectarea acestor suşe şi izolarea de drojdii termotolerante sînt obiectivele cercetărilor intense făcute în Japonia în scopul ameliorării competitivității producerii de etanol pe cale biologică.

Fabricarea alcoolurilor din cereale diferă de cea a berii prin absența etapei de fierbere a mustului, astfel încît fermentația se desfăşoară mai mult timp şi conținutul de alcool este mai ridicat. După felul distilării care urmează după fermentație se disting diferite tipuri de alcooluri: whisky-ul scoțian provine dintr-o distilare făcută în alambicuri mici, în timp ce majoritatea celorlalte tipuri de whisky sînt distilate în instalații care funcționează continuu. În cazul multor alcooluri, lichidul fermentat este transferat în alambicuri cu drojdii, care contribuie astfel la buchetul produsului final, ca şi compuşii provenind din lemnul butoaielor în care îmbătrînesc alcoolurile.



Imobilizarea celulelor de *Zymomonas mobilis* pe fibre de bumbac pentru producerea industrială de etanol.

Bacteriile acestei specii sînt de secole folosite în America Centrală la prepararea băuturilor fermentate, ca pulque, de exemplu, pornind de la sucul de agavă. Ele pot să fermenteze zaharurile dînd alcool etilic într-un mod mai eficace decît drojdia de bere, în special cînd celulele sînt imobilizate pe un substrat solid, cum sînt fibrele de bumbac închise într-o împletitură rigidă de material plastic (ca în imagine).

[Foto: C. E. Shively, Department of Biology, Alfred University, Alfred N.Y., S.U.A. În: Scientific American (New York), vol. 245, nr. 3, 1981, p. 134.]

Unul dintre factorii care limitează producerea de etanol prin fermentație este toleranța redusă, din partea microorganismelor, a concentrațiilor ridicate de alcool, astfel încît fermentația se oprește în momentul în care conținutul în alcool în mediu atinge valori destul de joase. Factorii de rezistență la alcool sînt puțin cunoscuți, dar această proprietate pare să fie legată de acizii grași nesaturați ai membranei celulare (acești acizi grași ar face ca membrana să fie mai permeabilă la etanol, ceea ce ar diminua concentrația sa intracelulară).

Fermentația alcoolică a cunoscut, de la creșterile succesive ale prețurilor petrolului, o dezvoltare însemnată, în măsura în care producerea de alcool în scopuri energetice reprezenta obiectivul esențial în programele naționale sprijinindu-se pe argumente tehnico-economice: cultura plantelor alcooligene pe vaste suprafețe disponibile, utilizarea de excedente de cereale, ameliorarea unei balanțe a plăților dezechilibrată de o factură petolieră din ce în ce mai greoaie, progrese tehnice în funcționarea motoarelor cu alcool (v.p. 191).

n-Butanolul (*n* = normal, moleculă neramificată) este utilizat în fabricarea plastifianților, uleiurilor de frînă, a rășinilor pe bază de uree — formaldehidă, a agenților de extracție și a adjuvanților benzinei.

Este fabricat aproape exclusiv pe cale chimică, dar, în 1912, Weizmann, care lucra la Universitatea din Manchester, a descoperit că în urma fermentației produse de *Clostridium acetobutylicum* și *C. saccharoacetobutylicum* asupra amidonului și respectiv zaharozei, rezultau *n*-butanol și acetonă. Weizmann a sintetizat apoi butadiena (cauciuc sintetic) pornind de la *n*-butanol. În timpul primului război mondial, cererea de acetonă era mare, deoarece acest solvent servea la fabricarea unui exploziv, cordita. Această cerere a scăzut după război, în timp ce nevoia de *n*-butanol creștea; în anii 1940 și 1950, producția de *n*-butanol prin fermentație a scăzut, deoarece prețurile materiilor prime de origine petrochimică erau inferioare celor ale porumbului sau melaselor.

n-Butanolul este, de asemenea, fabricat prin fermentația melaselor în Africa de Sud, unde uleiul furnizează energia necesară; bacteriile sînt recuperate și servesc drept aliment pentru vite. Procedeul fermentativ riscă să revină la modă, ca urmare a creșterii prețurilor petroliere.

Ca și în cazul etanolului, toxicitatea *n*-butanolului pentru bacterii este un factor care limitează fermentația acetono-butanolică. Primele sușe industriale de *C. acetobutylicum* fermentau 3,8% din amidon în plus pentru a produce 1,2% de *n*-butanol; selecția mutanților mai rezistenți la alcool nu a dat rezultate edificatoare, dar adăugînd carbon activat în mediul de fermentație, în condiții de laborator, concentrația de *n*-butanol pe care puteau să o tolereze bacteriile era mai ridicată (2,85%).

Producerea de metaboliți secundari

Metaboliții secundari, cunoscuți și sub numele de idioliți, sînt compuși cu greutate moleculară redusă care nu sînt indispensabili dezvoltării în cultură pură. Ei sînt produși de grupuri taxonomice restrînse și constau adesea într-un amestec de compuși cu structură asemănătoare, aparținînd aceleiași familii chimice. Acești metaboliți secundari sînt antibiotice, alcaloizi, hormoni de creștere a plantelor și toxinelor.

Microorganismele care produc metaboliți secundari au o fază inițială de creștere rapidă, tropofaza, în cursul căreia sinteza substanței secundare este neglijabilă. Cînd creșterea este foarte încetinită ca urmare a epuizării uneia dintre substanțele nutritive esențiale din mediul de cultură, idiofaza urmează tropofazei și idiolitul este sintetizat. În cazul antibioticelor, majoritatea microorganismelor sînt sensibile la propriile lor antibiotice în timpul tropofazei, dar devin rezistente în cursul idiofazei, astfel încît, dacă vrem să împiedicăm microbii să se autodistrugă cu antibioticele lor, trebuie să ajungem foarte repede la idiofază și să le menținem în ea.

Antibioticele constituie grupa cea mai importantă a substanțelor farmaceutice a căror sinteză este realizată de celule microbiene. Această grupă cuprinde și substanțe antifungice, compuși antitumorali și alcaloizi. Importanța economică a antibioticelor este atestată de faptul că vînzările pe plan mondial ale celor patru grupe de antibiotice mai des utilizate — peniciline, cefalosporine, tetracicline și eritromicine — s-au ridicat la peste patru miliarde de dolari în 1978 (în Scientific American, 1981).

Șase genuri de ciuperci filamentoase produc aproape 1000 de antibiotice diferite, printre care cefalosporinele (*Cephalosporium*) și penicilinele (*Penicillium*). Două tipuri de bacterii nefilamentoase sintetizează 500 de antibiotice, în timp ce trei genuri de actinomicete produc aproape 3 000 de antibiotice. Genul *Streptomyces* produce cele mai multe antibiotice, inclusiv tetraciclinele (*Streptomyces griseus* sintetizează peste 50 de antibiotice). Mucegaiul *Cephalosporium acremonium* a fost izolat în 1945 de Brotzu (Institutul de igienă din Cagliari) dintr-un eșantion de apă de mare; el sintetizează mai multe antibiotice, dintre care unul, cefalosporina C, este deosebit de eficace împotriva bacteriilor gram-pozitive rezistente la peniciline.

Filamente sau hife de mușchi *Cephalosporium acremonium*.

Acest mucegai sintetizează un antibiotic important, cefalosporina. Filamentele acestui microorganism prezintă proeminențe caracteristice în timpul fazei de producere optimă a antibioticului.

× 480

[Foto: E. A. Hartweig, Massachussetts Institute of Technology, S.U.A. În: Scientific American (New York), vol. 245, nr. 3, 1981, p. 54.]

Numărul de antibiotice descoperite cu fiecare an a crescut în mod liniar între sfîrșitul anilor 40 și începutul anilor '70, cînd erau caracterizați în fiecare an aproape 200 de compuși noi. La sfîrșitul anilor '70, erau descoperite 300 de noi molecule pe an, dintre care 50 proveneau din actinomicete (Demain, 1981).

Din apoape 5 500 de antibiotice cunoscute, au fost comercializate circa 100 (pînă în 1978) și majoritatea (69) au fost sintetizate de streptomicete. Penicilinele, cefalosporinele și tetraciclinele sînt antibioticele cele mai comercializate; din totalul vînzărilor din 1978 (4,2 miliarde de dolari), cele ale penicilinelor atingeau un miliard de dolari, ale cefalosporinelor — o jumătate de miliard și ale tetraciclinelor — un miliard (în Scientific American, 1981).

Producția mondială de antibiotice era de aproximativ 25 000 tone, dintre care circa 17 000 tone de penicilină, 5 000 tone de tetracicline, 1 200 tone de cefalosporine și 800 tone de eritromicine (în Demain, 1981).

Începînd din anii '60, izolarea mai dificilă de antibiotice eficace și rezistența pe care un mare număr de bacterii patogene au dezvoltat-o față de antibioticele folosite cel mai des au orientat cercetările către modificarea structurii antibioticelor pentru a le spori eficacitatea, a le proteja împotriva inactivării prin enzimele bacteriilor rezistente și a îmbunătăți și mai mult proprietățile lor farmaco-dinamice. Cercetările au avut ca obiect în primul rînd penicilinele și cefalosporinele a căror structură moleculară cuprinde un nucleu de β-lactamă cu patru atomi. Adăugarea unui grup metoxil (CH_3O—) la acest nucleu de β-lactamă dă cefamicine, înrudite cu cefalosporinele și eficiente împotriva microbilor gram-negativi și a celor rezistenți la penicilină. Hemisinteza constă în substituirea pe cale chimică a unui lanț pe nucleul de β-lactamă, după obținerea moleculei pe cale fermentativă.

În cazul penicilinei, această hemisinteză influențează penicilina G, care este produsă de *Penicillium chrysogenum* pornind de la acidul fenilacetic în mod continuu (de exemplu, 14 fermentatoare, cu un volum de 100 000 de litri fiecare, produc în decurs de 200 de ore de fermentare și de 15 ore de extracție și purificare sarea de potasiu a penicilinei cu puritate de 99,5%). Acidul fenilacetic este precursorul lanțului benzil lateral al moleculei. Aceasta

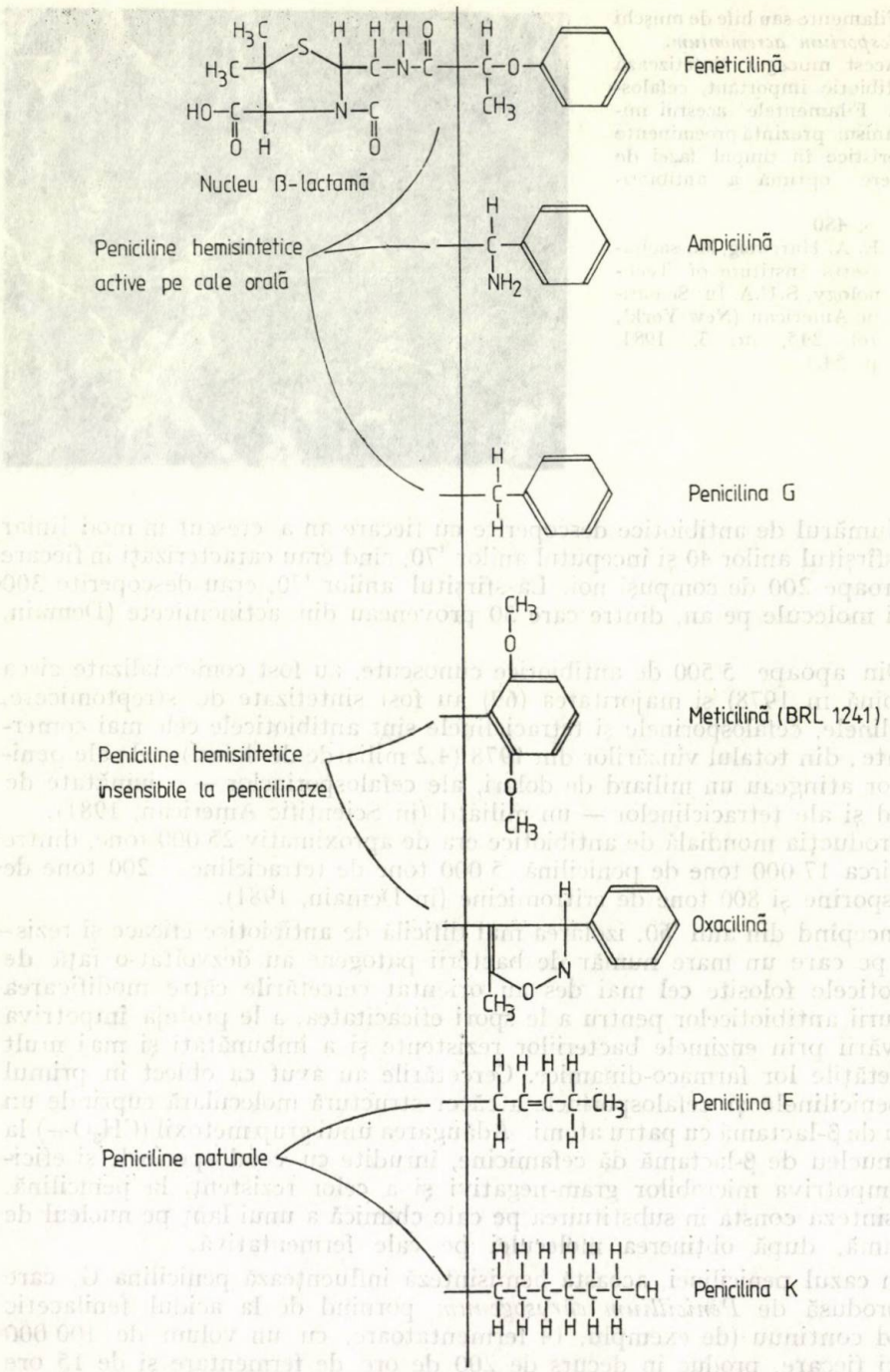


Fig. 10. Structura cîtorva peniciline naturale și hemisintetice.

este introdusă într-un mediu de cultură de bacterii care produc acilaze, a căror acțiune constă în a detașa grupul benzil al moleculei, pentru a da acidul 6-aminopenicilanic sau 6-APA. Acest acid este un antibiotic slab, dar el prezintă o structură foarte comodă pentru fixarea grupurilor chimice laterale care îi vor spori puterea de antibiotic (fig. 10, 11, 12).

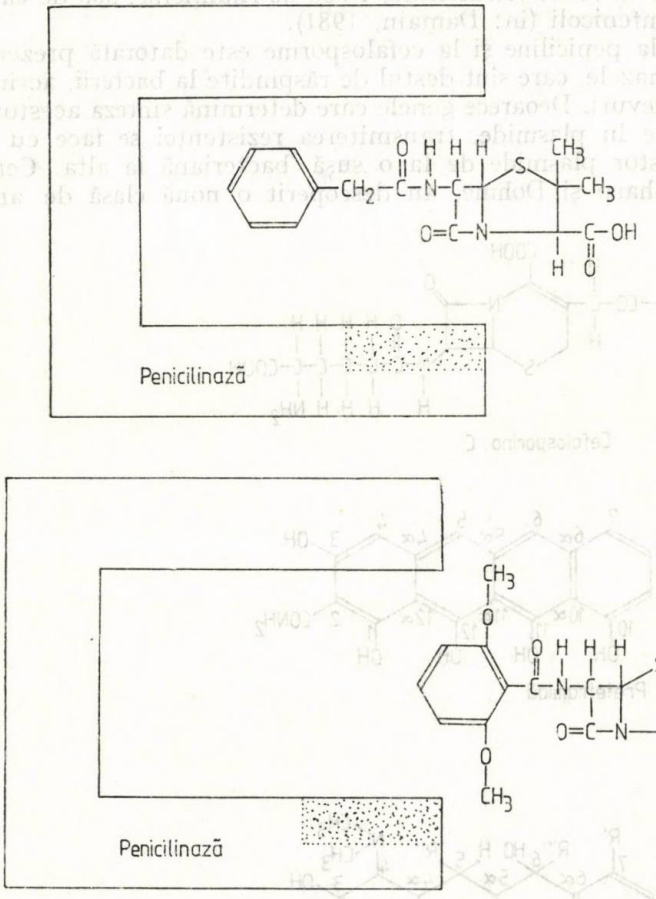


Fig. 11. Schema acțiunii penicilinazei. Penicilina induce sinteza penicilinazei care o degradează, în timp ce meticilina (BRL 1241) care induce și sinteza enzimei nu este degradată de aceasta din urmă din cauza structurii speciale a lanțului lateral.

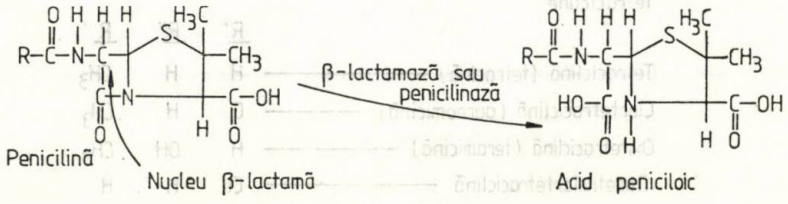
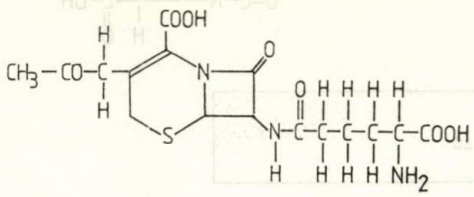


Fig. 12. Degradarea penicilinei de penicilinază (β-lactamaza).

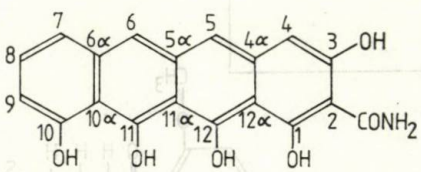
Hemisinteza constă, de asemenea, în cazul cefalosporinei C, în a adăuga catene laterale acidului 7-α-aminocefalosporanic sau 7-ACA, care se obține prin scoaterea unei catene amidă din cefalosporina C. Se obțin astfel cefalosporine hemisintetice (fig.13).

În 1974, prin hemisinteză au fost preparate 20 000 de peniciline, 4 000 de cefalosporine, 2 500 de tetracicline, 1 000 de rifamicine, 500 de canamicine și 500 de claromfenicoli (în: Damain, 1981).

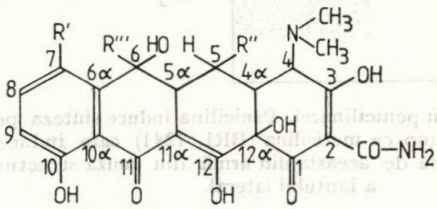
Rezistența la peniciline și la cefalosporine este datorată prezenței unor enzime, β-lactamazele, care sînt destul de răspîndite la bacterii, actinomicete, cianobacterii și levuri. Deoarece genele care determină sinteza acestor enzime se află localizate în plasmide, transmiterea rezistenței se face cu ajutorul transferului acestor plasmide de la o sușă bacteriană la alta. Cercetătorii firmei Merck, Sharp și Dohme, au descoperit o nouă clasă de antibiotice



Cefalosporina C



Pretetramidă



Tetracicline

	R'	R''	R'''
Tetraciclină (tetracină)	H	H	CH_3
Clortetraciclină (aureomicină)	Cl	H	CH_3
Oxitetraciclină (teramicină)	H	OH	CH_3
Dimetilclortetraciclină	Cl	H	H

Fig. 13. Structurile principalelor tetracicline, a pretetramidei și a cefalosporinei C.

β-lactamă, thienamicinele, produse de *Streptomyces cattleya*. Aceste antibiotice, care sînt foarte eficace împotriva bacteriilor gram-pozitive şi gram-negative, sînt capabile să inhibe β-lactamazele, ceea ce face să crească şi mai mult eficacitatea lor. Acizii clavulanic şi olivanic, izolaţi de cercetătorii de la Beecham Pharmaceutical Company, sînt, de asemenea, inhibitori ai β-lactamazelor; această firmă a fabricat un nou antibiotic, augmentina, care este o combinaţie de amoxicilină (antibiotic β-lactama) şi acid clavulanic.

În măsura în care producerea unui antibiotic depinde de intervenţia a 10—30 de gene, este aproape imposibil să aibă loc mutaţii spontane care ar face ca această producţie să crească de la cîteva miligrame pe litru în cazul suşei sălbatice la 20 de grame sau chiar mai mult pe litru de penicilină sau teraciclină în cazul suşelor industriale de *Penicilium chrysogenum* sau de *Streptomyces aureofaciens*. Aceste suşe deosebit de eficiente au fost obţinute în urma numeroaselor cicluri de mutaţii şi de selecţie. În cursul fiecărui ciclu, cultura era tratată cu o substanţă mutagenă şi erau observate şi testate mii de colonii pînă ce era izolat un mutant care sintetiza mai mult antibiotic; el constituia apoi punctul de pornire al unei noi operaţii de mutageneză şi de selecţie. Evoluţia microorganismului era orientată, în acest fel, într-o direcţie anormală, pentru a da o suşă interesantă din punct de vedere economic.

Pentru ameliorarea producţiei de penicilină, o suşă de *Penicillium chrysogenum* (NRRL-1951), care permite obţinerea a 60 de miligrame de penicilă pe litru, a dat mai întîi, prin mutaţie spontană, o suşă (NRRL-1951. B 25) care producea 150 de miligrame de penicilină pe litru (Departamentul American al Agriculturii, din Peoria-Illinois). Această suşă a fost supusă unui tratament cu raze X şi s-a obţinut astfel un mutant (X-1612) care producea 300 de miligrame de penicilină pe litru (Carnegie Institution, din Washington şi Universitatea din Minnesota). La Universitatea din Wisconsin, tratarea suşei X-1612 cu raze ultraviolete a permis izolarea unei suşe (WISQ-176) care producea 550 miligrame de penicilină pe litru. Cercetătorii de la Universitatea din Wisconsin şi-au continuat experienţele de mutaţie şi de selecţie pornind de la suşa WIS Q-176, şi, în afară de raze ultraviolete, ei au folosit yperita (gazul-muştar) ca agent mutagen.

Pornind de la una din suşele lor (WIS 51—20), laboratoarele firmei Eli Lilly au reuşit să izoleze o suşă cu rezultate deosebite (E-15.1) care producea şapte grame de penicilină pe litru; agentul mutagen utilizat fiind gazul muştar (yperita).

În total, în mai bine de 20 de ani, 21 de cicluri de mutaţie şi de selecţie au permis celor patru grupuri de cercetători să facă să crească producţia iniţială de penicilină de 55 de ori. Randamentele obţinute erau de fapt rezultatul experienţelor de mutaţie şi ameliorărilor aduse tehnicilor de fermentaţie. Mai tîrziu, aceste perfecţionări tehnice şi alte eforturi de selecţie au permis creşterea producţiei industriale de penicilină la 20 de grame pe litru, adică de 10 000 de ori mai mult decît cea obţinută în 1941 de Florey, Chain şi colaboratorii lor la Universitatea Oxford. A fost posibilă ameliorarea considerabilă a testării genetice prin automatizarea tehnicilor care permit, după inducerea mutaţiilor, să se observe zeci de mii de supravieţuitori pentru ai repera între aceştia mutanţii interesanţi.

Mutaţiile au putut, de asemenea, să dea naştere unor noi metaboliţi secundari, ca, de exemplu, 6-dimetilclortetraciclina şi 6-dimetiltetraciclina.

Unii mutanți, numiți idiotrofi, sînt capabili să sintetizeze numai o parte din molecula unui antibiotic, iar cealaltă parte trebuie să le fie furnizată în mediul de cultură. Această formă de biosinteză a permis descoperirea unor noi derivați de antibiotice cum ar fi cei aparținînd grupei aminoclitolului (în Demain, 1981).

Hopwood și colaboratorii săi (John Innes Institute, Marea Britanie) au descoperit că sinteza anumitor antibiotice datorată diverselor specii de *Streptomyces era* condusă nu de gene cromozomiale, ci de gene plasmidiale.

Transferul într-o singură celulă de *Streptomyces* a mai multor plasmide ar putea avea drept consecință convergența diferitelor căi metabolice spre biosinteza unor noi antibiotice.

Arsenalul substanțelor antitumorale de origine microbiană este destul de redus. Bleomicina, care a fost izolată de Umezawa și colaboratorii săi (Institutul de chimie microbiană din Tokio) din culturi de *Streptomyces verticillus*, este o glucopeptidă a cărei acțiune constă în clivarea ADN-ului celulelor tumorale și în inhibarea replicării ADN-ului și ARN-ului. O altă grupă de substanțe tumorale este compusă dintr-un aminoglucozid și o moleculă de anthraciclină. Inconvenientul pe care îl prezintă bleomicina și anthraciclinele este că ele pot cauza leziuni cardiace.

Producerea de enzime

În cazul enzimelor, ce sînt macromolecule a căror activitate depinde de structura lor primară, adică de secvența aminoacizilor constitutivi, o sinteză chimică pe scară largă nu este totdeauna posibilă, și nici de dorit. Ele sînt extrase din celulele animale sau vegetale, sau produse de microorganisme. Cu excepția papainei, extrasă din papaia, și care servește la frăgezirea cărnii, enzimele folosite în procedeele de fabricație industriale sau semiindustriale sînt toate de origine microbiană și patru din ele sînt produse în cantități mari: proteazele, glucoamilaza, α-amilaza și glucoz-izomeraza. Degradarea amidonului, fabricarea sucurilor de fructe, a pîinii, a laptelui, a berii, a vinului și a detergenților consumă mari cantități de enzime de origine microbiană (tabelul 9).

Tabelul 9. **Domenii de utilizare industrială a microbilor și de aplicare a principalelor enzime de origine microbiană (principalele specii microbiene utilizate)**

Producerea de băuturi și de alimente fermentate
Bonită uscată, sos de soia *(Aspergillus oryzae, Pediococcus soyae, Saccharomyces rouxii, Torulopsis* spp.*)*, oțet *(Gluconobacter suboxidans)*, legume conservate în oțet, brînzeturi *(Penicillium camembertii, P. roquefortii, Propionibacterium shermanii, Streptoccoccus* spp.*)*, iaurt *(Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus)*, băuturi pe bază de acid lactic.
Fermentația alcoolică
Bere *(Saccharomyces cerevisiae, S. carlsbergensis, S. uvarum)*, cidru *(S. cidri)*, vin *(S. cerevisiae)*, saké *(Aspergillus oryzae, Lactobacillus* și *Leuconostoc* spp., *S. cerevisiae)* și alte fermentații de suc de fructe, alcooluri albe etc.

Utilizarea celulelor microbiene și producerea de substanțe fiziologice active în industria alimentară și farmaceutică

Prepararea de vaccinuri și de bioinsecticide microbiene *(Bacillus popilliae, B. thuringiensis)*
Drojdie pentru panificație *(Saccharomyces cerevisiae; Candida milleri)*
Drojdii pentru furajarea animalelor *(Candida utilis, Saccharomycopsis lipolytica)*
Spiruline, clorele și alte alge unicelulare; proteine de organisme monocelulare *(Methylophilus methylotrophus, Candida, tropicalis, C. utilis, Saccharomyces lipolytica)*.
Aminoacizi, mononucleotide *(Corynebacterium glutamicum)*
Vitamine (riboflavină; *Eremothecium ashbyi;* vitamina B_{12}; *Propionibacterium* sp., *Pseudomonas denitrificans)*
Steroizi *(Arthrobacter simplex, Mycobacterium* sp., *Rhizopus arrhizus, R. nigricans)*
Carotenoizi (β-caroten: *Blakeslea trispora;* astaxantină: *Phaffia rhodozyma)*
Gibereline *(Gibberella fujikuroi)* și alți hormoni de creșterea plantelor

Producerea de solvenți industriali și de acizi organici pentru industria chimică

Alcool etilic *(Kluyveromyces fragilis, S. cerevisiae, Zymomonas mobilis);* n-butanol și acetonă *(Clostridium acetobutylicum, C. saccharoacetobutylicum);* acizi: acetic *(Acetobacterium woodii, Clostridium aceticum)*, citric *(Aspergillus niger, Saccharomyces lipolytica)* fumaric, lactic *(Lactobacillus delbrueckii)*

Producerea de polizaharide pentru industria alimentară și pentru alte întrebuințări

Dextrane *(Leuconostoc mesenteroïdes)*, levane, manane; xantane *(Xanthomonas campestris)*

Producerea de antibiotice

Peniciline *(Penicillium chrysogenum)*, cefalosporine *(Cephalosporium acremonium)*, streptomicină, canamicine, neomicine, tetracicline etc. *(Steptomyces* spp.) gramicidină S. *(Bacillus brevis)*, polimixina B *(Bacillus polymyxa)* bacitracină *(Bacillus subtilis)*

Depoluare

Tratarea efluenților industriali, a apelor uzate, a deșeurilor și gunoaielor; recuperarea și recircularea deșeurilor biodegradabile.

Spălarea cu leșie a minereurilor și recuperarea resturilor miniere [1]

Microorganisme utilizate la fabricarea cîtorva tipuri de brînzeturi

Brînză albă	*Streptococcus lactis, S. cremoris, S. diacetilactis Leuconostoc citrovorum*
Brînzeturi moi	
Brie (Franța)	*Streptococcus lactis, S. cremoris Penicillium camembertii, P. candidum Brevibacterium linens*
Camembert (Franța)	*Streptococcus lactis, S. cremoris Penicillium camembertii, P. candidum*
Brînzeturi semitari	
Bleu d'Auvergne (Franța)	*Streptococcus lactis, S. cremoris Penicillium roquefortii* sau *P. glaucum*
Gorgonzola (Italia)	*Streptococcus lactis, S. cremoris Penicillium roquefortii* sau *P. glaucum*
Munster (R.F.G.)	*Streptococcus lactis, S. cremoris Brevibacterium linens*
Roquefort (Franța)	*Streptococcus lactis, S. cremoris Penicillium roquefortii* sau *P. glaucum*
Brînzeturi tari	
Cheddar (Marea Britanie)	*Streptococcus lactis, S. cremoris, S. durans, Lactobacillus casei*
Colby (S.U.A.)	*Streptococcus lactis, S. cremoris, S. durans Lactobacillus casei*

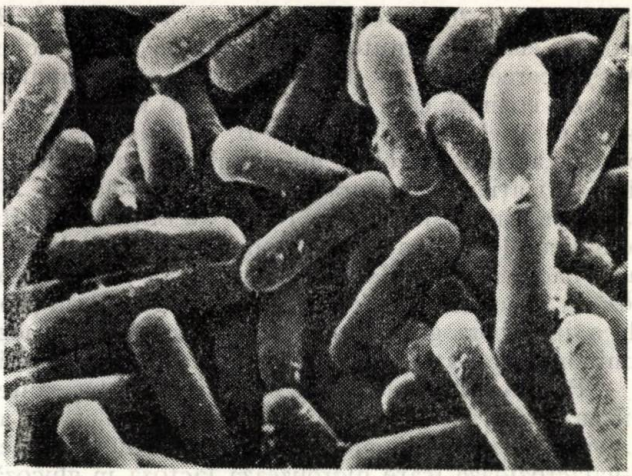
Tabelul 9 (continuare)

Edam (Olanda)	*Streptococcus lactis, S. cremoris*
Gouda (Olanda)	*Streptococcus lactis, S. cremoris*
Gruyère (Elveția)	*Streptococcus lactis; S. thermophilus* *Lactobacillus helveticus* *Propionibacterium shermanii* sau *Lactobacillus bulgaricus* și *Propionibacterium freudenreichii*
Brînzeturi foarte tari	
Parmesan (Italia)	*Streptococcus lactis, S. cremoris, S. thermophilus* *Lactobacillus bulgaricus*

Enzime și aplicațiile lor

Amilaze bacteriene și fungice *(Bacillus* sp.; *Aspergillus niger, A. oryzae)*	Hidroliza amidonului în dextrine, în maltoză și în glucoză; îndepărtarea amidonului; zaharificarea substanțelor amilacee pentru fermentația alcoolică
Proteaze bacteriene și fungice *(Bacillus licheniformis, B. subtilis; Aspergillus* spp., *Saccharomyces cerevisiae)*	Liza proteinelor de origine animală și vegetală; prepararea brînzeturilor; fabricarea sosului de soia și de condimente pe bază de aminoacizi; tratarea pieilor. Activanți digestivi Eliminarea depozitelor de proteine în băuturile fermentate; frăgezirea cărnii (papaină)
Cheag fungic («renină») (Endothia, parasitica, Mucor sp.)	Închegarea laptelui
Lipază *(Sacharomycopsis lipolytica)*	Fabricarea untului și a gliceridelor; activanți digestivi
Pectinaze fungice *(Aspergillus* spp.)	Clarificare sucului de fructe și a vinului
Hemicelulaza fungică	Hidroliza hemicelulozelor cerealelor și legumelor
Celuloză fungică *(Trichoderma reesii)*	Hidroliza celulozei în glucoză
Inulază bacteriană și fungică	Hidroliza inulinei în fructoză
Invertază *(Saccharomyces cerevisiae)*	Producerea zahărului invertit (amestec de glucoză și de fructoză) pornind de la zaharoză
Glucoza izomeraza bacteriană *(Bacillus* spp.)	Izomerizarea glucozei în fructoză (fabricarea siropurilor de fructoză pornind de la amidonul de porumb)
Naringinaza fungică	Înlăturarea gustului amar al sucului de fructe
Antocianaza fungică	Decolorarea sucurilor de fructe
ADN-aza, ribonucleotidaza bacteriană și fungică	Hidroliza ADN-ului, producerea de monodezoxiribonucleotide și de ribonucleotide, fabricarea de acid inozinic
Glucoz-oxidaza și catalaza *(Corynebacterium* spp.)	Înlăturarea oxigenului și antisepsia alimentelor; fabricarea prafului de ou deshidratat (eliminarea glucozei)
Uricază de drojdie și de *Streptomyces*	Descompunerea acidului uric
Aspartază și fumerază bacteriene *(Bacillus* ap.)	Producerea de acid aspartic pornind de la acid fumaric și de acid malic pornind de la acid fumaric.

[1] Unele minereuri cu conținut redus pot fi într-adevăr tratate cu soluții ce conțin sușe bacteriene litoautotrofe *(Thiobacillus ferrooxidans, Thiobacillus thiooxidans, Leptospirillum ferrooxidans, Sulfobacillus thermosulfidooxidans)* pentru a fi recuperate metalele pe care le conțin. De exemplu, în Canada, în mina din Stanrock, aceste operații de spălare cu leșie făceau posibilă recuperarea a șapte tone de uraniu pe lună (v. și Sasson, 1970; Brierly, 1972)



Celule de *Bacillus brevis*. Microfotografie a unor celule de *Bacillus brevis*, luată la microscopul cu baleiaj. Această specie bacteriană sintetizează gramicidina S. × 5 500
[Foto: E. A. Hartwieg, Massachussetts Institute of Technology, S.U.A. În Scientific American (New York), vol. 245, nr. 3, 1981, p. 54.]

Cantitățile produse pentru aceste patru tipuri de enzime erau, în 1980, de 530 de tone pentru proteaze, 350 de tone pentru glucoamilază, 320 de tone pentru α-amilază și 70 de tone pentru glucoz-izomerază, vînzările reprezentînd aproape 300 000 000 de dolari în întreaga lume (în Scientific American, 1981). Această producție industrială era dominată de firmele europene, 60% din piață deținute de Novo Industri (Danemarca) și de Gist-Brocades (Olanda, v. pag. 237).

Microbii se pretează foarte bine la producerea enzimelor deoarece concentrațiile acestora pot fi sporite considerabil prin acționarea asupra factorilor de mediu sau prin modificarea genomului lor. Printre celelalate avantaje oferite de microorganisme, trebuie amintite: viteza de creștere rapidă, proprietatea de a crește pe medii cu prețuri de revenire mici, precum și existența de enzime distincte provenind din sușe diferite și catalizînd aceeași reacție (în acest caz, este posibil să se aleagă condițiile procesului de producție în funcție de proprietățile fizico-chimice ale enzimelor).

Enzimele de origine microbiană au înlocuit din ce în ce mai mult enzimele de origine animală sau vegetală, astfel: amilazele de *Bacillus* și de *Aspergilles* le-au înlocuit pe cele ale grîului și orzului germinate (malț) în fabricile de bere, în brutării și în fabricarea biscuiților, în industria textilă; proteaza de *Aspergillus* a înlocuit enzimele animale și vegetale pentru frăgezirea cărnii; proteazele de *Aspergillus* și de *Bacillus licheniformis* pe cele pancreatice în tăbăcirea pieii și fabricarea detergenților; reninele de *Mucor* au înlocuit cheagul în prepararea brînzeturilor.

Transformarea amidonului de porumb într-un amestec de glucoză și de fructoză sau „siropuri de fructoză de porumb" (high fructose corn syrups), care înlocuiește zaharoza din băuturile dulci nealcoolizate și din alte produse alimentare, a adus dovada interesului pentru producția de enzime de origine microbiană. Această transformare cuprinde trei etape, în cursul cărora acționează pe rînd α-amilaza, glucoamilaza și glucoz-izomeraza. Producția mondială era, în 1980, de peste 2 milioane de tone de siropuri de fructe, dintre care peste jumătate în S.U.A. (în Scientific American, 1981; v.pag. 218).

Ameliorarea randamentului acestei transformări este funcție de costul enzimelor. Maruo și colaboratorii săi (Universitatea Nihon) au reușit să facă

să crească de 200 de ori producția de α-amilază la *Bacillus subtilis*, combinînd metoda clasică de mutație și de selecție cu tehnicile de recombinare genetică. Acești cercetători au descoperit un anumit număr de procese de reglare a sintezei enzimei, care sinergic pot spori în mod foarte clar producția de α-amilază în sușele selecționate de *B. subtilis*. Pe de altă parte, dacă enzima ar putea cataliza hidroliza amidonului la o temperatură mai ridicată, viteza de fabricație a edulcoranților ar fi accelerată. Shinomiya și colaboratorii săi de la Universitatea din Tokio, au obținut cantități mai mari de α-amilază termostabilă, ca urmare a introducerii în celulele de *B. subtilis* a genei amilazei unei bacterii termofile. Un alt mijloc de a spori producția siropurilor de fructoză ar fi condensarea celor trei etape ale acestui proces într-una singură, adică de a încorpora genele celor trei enzime în cromozomul aceluiași organism; amidonul ar fi atunci convertit în sirop de fructoză în același reactor.

Printre celelalte enzime cu aplicații interesante, se pot enumera aminoacilaza (care permite separarea amestecurilor de aminoacizi în izomerii lor L și D), penicilin-acilaza (pentru producerea penicilinelor hemisintetice), β-galactozidaza (care hidrolizează lactoza în glucoză și galactoză), celulazele, hemicelulazele și enzimele care degradează lignina. Din cele 2 000 de enzime descrise în literatura de specialitate, numai 200 erau disponibile pentru utilizare în industrie.

Anumite enzime joacă un rol din ce în ce mai important în diagnosticul medical: astfel, colesterol-oxidaza servește la dozarea concentrațiilor de colesterol în serul sangvin și uricaza la dozarea concentrațiilor acidului uric. Cercetările de inginerie genetică folosesc endonucleaze de restricție, care taie ADN-ul și ligazele care sudează extremitățile acizilor nucleici astfel clivați. Davis și colaboratorii săi de la Stanford University School of Medicine au făcut să crească de 500 de ori sinteza ligazei, introducînd mai multe cópii ale genei corespondente în celulele de *E. coli*. Diagnosticul prenatal al sicklemiei se poate face prin tratarea ADN-ului celulelor fetale ale lichidului amniotic cu o endonuclează de restricție, în loc să se preleveze un eșantion din sîngele fătului.

Enzimele de origine microbiană ar putea să joace și un rol important în industria materialelor plastice, a căror cifră de afaceri era evaluată la 50 de miliarde de dolari în 1980 (în Scientific American, 1981). Mai multe substanțe de acest fel sînt constituite prin polimerizarea de oxizi de alcene, adică de oxizi de lanțuri carbonice neramificate și conținînd cel puțin o legătură dublă. Acești oxizi sînt sintetizați pornind de la derivați ai petrolului, dar Neidelman (Cetus Corporation) a reușit să regleze fabricarea oxidului de propilenă pe cale enzimatică și, după părerea președintelui societății Cetus, comercializarea unui asemenea produs ar fi posibilă înainte de 1990, pentru a ajunge la o producție comercializată în valoare de 2—3 miliarde de dolari pe plan mondial (în Scientific American, 1981). Această sinteză se bazează pe trei enzime: piranoza-2-oxidaza, extrasă din ciuperca bazidiomicetă *Oudemansiella mucida*, ce catalizează formarea apei oxigenate pornind de la glucoză care este substratul și sursa de energie; haloperoxidaza unei alte ciuperci, *Caldariomyces*, catalizează combinația apei oxigenate cu un alcen și un ion halogen (fluorură, clorură sau bromură) pentru a da un alcen legat la o grupare hidroxil (OH) și la un halogen; o epoxidază de la *Flavobacterium* detașează hidrogenul din gruparea hidroxil și ionul halogen al oxidului de alcen. Avantajele producerii de acest tip față de sinteza chimică sînt următoarele: ionul halogen

poate fi furnizat de o sare banală, de exemplu clorura de sodiu, și astfel este mai ieftin decît elementul halogen indispensabil sintezei chimice; unii subprodușî ai biosintezei cum ar fi fructoza și acidul gluconic sînt utili, primul datorită puterii sale de îndulcire, al doilea deoarece este încorporat în detergenții utilizați în mașinile de spălat vesela și împiedică precipitarea sărurilor de calciu și de magneziu; conversia de glucoză mai întîi în glucozon, apoi în fructoză, are un randament de 100%, în timp ce, în hidroliza amidonului în siropuri de fructoză, acest randament este cel mult egal cu 50%; modificînd substratul haloperoxidazei, este posibil să se ajungă la oxizi de alcene diferite, ca oxidul de propilenă pentru fabricarea polipropilenei și oxidul de etilenă pentru fabricarea polietilenei; un ultim avantaj al biosintezei este absența substanțelor poluante, deoarece halogenul poate fi reciclat.

Cantitățile celor trei enzime produse de microbii lor respectivi ar putea să fie sporite prin aplicarea tehnicilor de recombinare genetică. Aceste tehnici ar putea, cu timpul, să modifice situsurile active în scopul creșterii activității lor catalitice; iată, printre altele, și obiectivele firmei Cetus Corporation (v. pag. 220).

Imobilizarea enzimelor prezintă următoarele avantaje: creșterea stabilității, *p*H de acțiune optim, obținerea de produși de o mare puritate, recuperarea și reutilizarea cu mai multă ușurință a biocatalizatorilor, reducerea proceselor de inhibiție ale enzimelor.

Poliozide capsulare

Poliozidele capsulare sînt produși microbieni sintetizați în cantități însemnate. Dextranii, a căror greutate moleculară este cuprinsă între 50 000 și 100 000, servesc drept substituent al plasmei sanguine; cînd lanțurile polimerului sînt legate între ele, rezultă corpusculi care constituie filtre moleculare foarte eficace. Dextranii sînt sintetizați de *Leuconostoc mesenteriodes* și de bacteriile lactice, dar numai atunci cînd mediul de cultură conține, ca substrat, zaharoza. În capsula celulară, dextranul este un polimer al glucozei, a cărui greutate moleculară variază între 15 000 și 20 de milioane în funcție de sușa microbiană. Bacteriile conțin o enzimă, transglucozidaza sau dextransucraza, care hidrolizează zaharoza în glucoză și fructoză; în timp ce fructoza asigură creșterea bacteriei, glucoza este polimerizată în dextran.

Xantanii constituie o substanță asemănătoare gumei, produsă de *Xanthomonas campestris*, atunci cînd microbul se dezvoltă pe un mediu ce conține glucoză și în condiții de aerobioză. Xantanii sînt polimeri ramificați, formați din molecule de glucoză, manoză, acid glucuronic, care poartă uneori grupări acetil (CH_3CO) și piruvat (CH_3COCO). Xantanii, care pot fi consumați fără pericol, se adaugă numeroaselor produse alimentare ca agenți care măresc viscozitatea sau ca stabilizanți. Ei sînt utilizați, de asemenea, în industria textilă (vopsire și imprimare), în fabricarea produselor cosmetice, a produselor farmaceutice și în forajul puțurilor de petrol (ca adaos la nămolul de foraj

Fermentații în mediu solid

Fermentațiile în mediu solid sînt adesea opuse celor care se desfășoară într-un mediu lichid. Practicate de vreme îndelungată în mod meșteșugăresc în alimentația tradițională, ele se referă mai ales la transformările produselor agricole și alimentare cu ajutorul mucegaiurilor.

Fabricarea brînzei pornind de la proteinele din lapte este o fermentație în mediu solid care este de asemenea un procedeu de conservare a laptelui. Într-adevăr, în absența unor măsuri de precauție speciale, laptele este contaminat rapid de bacterii și de alte microorganisme, care îl fac să se acrească transformînd lactoza în acid lactic. În zilele noastre, fabricarea produselor lactate fermentate se află, între industriile bazate pe procedee microbiene, pe locul al doilea în privința vînzărilor, după băuturile alcoolizate.

În prima fază a fabricării brînzei, laptele este inoculat cu o cultură de bacterii (una sau mai multe specii), apoi se adaugă în acest amestec o enzimă proteolitică ce sevește la închegarea laptelui; se folosea în acest scop cheagul de vițel neînțărcat, dar din ce în ce mai mult acesta este înlocuit de enzime de origine microbiană. Cheagul este apoi separat de zer, presat pentru a elimina o parte din apă și înfășurat într-o pînză pentru a se usca. În timpul fazei de maturație a brînzei, la suprafața acesteia pot să se dezvolte microorganisme care contribuie la calitățile ei organoleptice. Marea varietate pe care o cunoaște brînza se explică prin natura și proprietățile sușelor microbiene introduse inițial în lapte, prin temperatura de fabricație și prin prezența sau absența unei microflore secundare care se dezvoltă pe brînză (v. tabelul 9).

Varietățile de brînză moale au un conținut de apă de 50—80% și cuprind produse finite cum ar fi brînza albă și produse al căror afinaj are loc datorită dezvoltării levurilor și mucegaiurilor (*Penicillium*) pe suprafața lor (caș-caval de Brie, brînză de Camembert). Brînzeturile semitari sînt fierte pentru puțin timp pentru ca apa să nu fie într-o cantitate mai mare de 45%; unele sînt introduse într-o saramură, ceea ce determină înmulțirea levurilor și bacteriilor pe suprafața lor. Brînzeturile tari, al căror conținut de apă este egal sau mai mic de 40%, pot avea o floră bacteriană simplă (cedar) sau pot fi inoculate cu spori de *Penicillium roquefortii*; creșterea mucegaiurilor în interiorul pastei de brînză dă acesteia gustul și aroma specifică (bleu danois, gorgonzola, roquefort). În cazul unei varietăți de șvaițer (gruyère), sînt adăugate în lapte propionibacterii care, producînd dioxid de carbon, determină formarea găurilor caracteristice acestui tip de brînză.

Iaurtul se obține prin fermentarea laptelui integral cu ajutorul a două bacterii lactice simbiotice, *Lactobacillus bulgaricus* și *Streptococcus thermophilus*. Temperatura fermentației este de aproximativ 40°C. Gustul caracteristic al iaurtului se datorează acidului lactic care provine din lactoza laptelui și acetaldehidei, cele două substanțe fiind produse de *L.bulgaricus*.

Smîntîna acră se obține după fermentarea smîntînii pasteurizate cu ajutorul bacteriilor lactice; zara provine din fermentarea laptelui smîntînit sau semismîntînit cu ajutorul unui amestec de bacterii lactice și alte bacterii înrudite. Alte băuturi lactate fermentate sînt chefirul și cumisul, consumate în țările Europei centrale, și vilia, consumată în Finlanda.

Conservarea legumelor comportă introducerea lor într-o saramură și fermentarea lor. În saramură se produce mai întîi dezvoltarea microflorei aerobe aflată pe legume, apoi intră în activitate bacteriile lactice, precum și levurile aparținînd genurilor *Sacharomyces* și *Torulopsis*; fermentația duce la producerea de acid lactic și de acid acetic. Levurile le iau locul, apoi bacteriile lactice și fermentația încetează cînd au fost utilizate toate glucidele fermentabile ale legumelor. Mai multe specii de levuri aparținînd genurilor *Candida*, *Debaryomyces* și *Pichia*, continuă totuși să crească pe suprafața saramurii. Tehnicile moderne de conservare a legumelor folosesc culturi microbiene selecționate, în special de bacterii lactice. Pasteurizarea, după introducerea în conservă, pune capăt activităților microbiene și asigură calitatea produsului livrat spre consum.

În Franța, cercetătorii secției de procedee tehnologice a Universității de Tehnologie din Compiégne și societatea Christ în Sarthe, au pus la punct un nou procedeu de fabricare a verzei acre. Putinele ce conțineau 6,6 tone de varză, în loc de 20—110 tone în fabricarea obișnuită, erau din material plastic; căptușeala interioară a pereților lor nu reacționa la aciditatea verzei acre și puteau fi transportate, dar era nevoie de cel puțin o lună pentru a obține o varză acră consumabilă. Ameliorarea procedeului a permis obținerea unei verze acre într-un interval de opt zile: zeama era colectată la partea inferioară a putinei la 15°C, încălzită la 25 . . . 26 °C și reintrodusă prin partea de sus, astfel încît foile de varză erau în contact constant cu lichidul și bacteriile realizau fermentația mai repede datorită încălzirii. Această nouă tehnică de fabricație accelerată, al cărei brevet a fost obținut în 1978, urma să fie aplicată în 1979 și avea drept consecință o creștere a producției de varză acră, dar și a deșeurilor. Tratarea acestora din urmă era efectuată de o levură, *Candida utilis*, izolată de cercetătorii Universității din Compiégne în zeama de varză acră, și care transforma 25% din acidul lactic în biomasă protidică; astfel, lichidele reziduale își pierdeau aciditatea, *p*H-ul lor urca pînă la 7, ele puteau fi socotite drept adevărate centre de epurare. Această tehnică nouă, care era complementară celei relative la producerea accelerată de varză acră, avea, așadar, meritul de a reduce considerabil poluarea produsă de zeamă de varză; aplicarea ei a început în Franța, în 1977.

În cazul laptelui și legumelor (și anumitor fructe—măslinele, de exemplu); fermentațiile au adesea drept scop să păstreze substanțele nutritive ale acestor alimente, care s-ar degrada rapid și nu ar mai putea fi consumate. Alte fermentații alimentare au ca obiectiv esențial evidențierea gustului și aroma alimentelor, făcînd să crească în același timp și concentrația lor în proteine. Aceste alimente fermentate sînt pe bază de pește sau boabe de soia; prepararea și consumarea lor sînt importante mai ales în țările din Extremul Orient, unde contribuția lor este esențială în privința aportului protidic al regimului alimentar.

În Indonezia, tempeh-urile care conțin pînă la 55% proteine, se prezintă sub forma unei paste compacte preparată din boabe de soia (*kedele*), de arahide (*ontjom*) sau nuci de cocos (*bongkrek*).

Începînd din 1960, în S.U.A., au fost făcute cercetări asupra diferitelor etape ale preparării temphnului, asupra mucegaiurilor care intră în această fermentație și asupra calităților nutritive ale acestui aliment. Steinkraus (Departamentul de Agronomie al Universității Cornell) și Hesseltine (Centrul de Cercetări Agricole din Peoria-Illinois) au fost primii care au efectuat aceste

cercetări, care urmau să fie corelate cu alte lucrări referitoare la prepararea de alimente locale bogate în proteine și puțin costisitoare.

Prepararea tempehului necesită două-trei zile. Boabele de soia sînt mai întîi lăsate să se înmoaie timp de aproape 12 ore, apoi coaja lor este înlăturată (în Indonezia, procedeul tradițional constă în a strivi cu picioarele boabele în coșuri de bambus împletite și a trece prin ele un curent de apă pentru înlăturarea cojilor); cotiledoanele sînt apoi fierte timp de jumătate de oră, ceea ce are ca efect distrugerea unui factor de inhibiție a creșterii (care face ca soia crudă să fie improprie consumului). După ce boabele au fost spălate îndelung cu apă și apoi scurse, sînt însămînțate cu spori de mucegai de *Rhizopus oligosporus*, care sînt introduși în masa boabelor dispuse pe platouri sau frunze de banan sau de teck (în modul de preparare tradițional). Inocularea se face în general cu ajutorul fragmentelor de tempeh gata preparat. Fermentația durează 36—38 de ore, la aproximativ 31°C, iar rezultatul este o substanță de culoare maro deschis, de consistență solidă, formată de pasta de soia și masa hifelor miceliene de *Rhizopus*. Tempehul este în general consumat fiert sau prăjit în ulei de nuci de cocos.

În cursul fermentării, α-galactozidele sînt hidrolizate, precum și 30% din gliceride (eliberînd un acid gras esențial, acidul linoleic, în cantitate de 2,5 grame la 100 de grame), dar concentrația în lipide a tempehului rămîne apropiată celei de soia, între 20 și 26% din greutatea substanței uscate; concentrația de proteine crește, deoarece este cuprinsă între 50 și 55% din greutatea substanței uscate, față de 40—43% în boabele de soia (concentrația de azot solubil crește de la 0,5 la 2%, deoarece o parte însemnată din proteine se descompun în aminoacizi cu ajutorul enzimelor proteolitice ale mucegaiurilor). *p*H-ul evoluează spre neutralizare: de la 5 la 7,6. Așadar, este vorba mai ales despre transformări calitative importante, deoarece, pornind de la 100 g de soia coaptă se obține o masă puțin mai redusă de tempeh; acesta din urmă este un aliment cu valoare nutritivă ridicată și deosebit de ușor de digerat. Este bogat și în riboflavină (vitamina B_2: 7 μg/g) și în niacină (vitamina împotriva pelagrei PP; 60 μg/g), ale căror concentrații sînt respectiv egale cu de două ori și respectiv de cinci ori cele ale boabelor de soia. Tempehul fabricat după modul tradițional conține vitamina B_{12} (5—30 μg/g), care este sintetizată de o bacterie și nu de mucegai; această bacterie este eliminată în cazul preparării controlate în laborator, care duce la un tempeh fără cianocobalamină.

Tehnicile de fabricare industrială sau semiindustrială a tempehului au păstrat aceleași etape ca prepararea tradițională, deoarece acestea garantau nu numai o concentrație maximă nutritivă, dar și eliminarea substanțelor nocive sau inhibitoare conținute în boabele de soia.

Bongkrek-ul este preparat în partea centrală din Java din turtă de copra cu același mucegai ca pentru tempeh (*R. oligosporus*). În partea occidentală a insulei turta de arahide servește la prepararea a două varietăți de ontjom, una maro închis sau neagră, cu *Rhizopus*, cealaltă roșie, cu *Neurospora sitophila*. În cazul bongkrekului, ca și în cazul ontjomului, contaminarea cu bacterii (*Pseudomonas*) sau cu mucegaiuri (*Aspergillus flavux*) poate avea ca efect producerea de toxine foarte periculoase (toxoflavina și aflatoxina).

Cercetări efectuate la Universitatea Agricolă și la Institutul de Cercetări asupra Nutriției din Bogor au avut ca obiect ameliorarea tehnicilor de a produce aceste alimente și de a lupta împotriva contaminării microbiene.

La rîndul lor, cercetători americani au adaptat tehnica fabricării tempehului indonezian pentru cereale sau pentru manioc. Ei au constatat că grîul fermentat timp de 20 de ore la 31°C de aceeași specie de mucegai, *R. oligosporus*, dădea un produs conținînd de 6—7 ori mai multe proteine, de 5 ori mai multă riboflavină și de 2 ori mai multă niacină decît boabele de grîu. Avantajul prezentat de *R. oligosporus* era că acest mucegai producea puțină amilază, lucru care făcea să se evite hidroliza unei prea mari cantități de amidon din grîu și intervenția fermentației alcoolice.

Alimente de calitate, preparate după tehnici seculare, tempehul indonezian și varietățile elaborate din arahide și nuci de cocos merită fără îndoială o răspîndire care depășește aria lor regională, pe baza proprietăților lor nutritive (conținut bogat în proteine, vitamine, acizi grași esențiali și conținut sărac în corpi grași saturați), a simplității preparării lor și a costului redus.

Printre celelalte alimente fermentate, se pot cita: miso-ul japonez (700 000 de tone pe an în 1980), care se obține prin fermentarea unei paste din boabe întregi de soia cu ajutorul lui *Aspergillus oryzae* (în Japonia, consumul mediu de miso era de 24 de grame de persoană și pe zi în 1980); sufu-ul chinezesc care are consistența brînzei și care este o pastă de soia fermentată de mai multe specii de mucegaiuri, în special din genul *Mucor*; angkak-ul, fabricat tot în China, pe bază de orez fermentat de mucegai *Monascus purpureus* (în acest caz, nu este vorba de evidențierea gustului orezului, ci de colorarea lui în roșu); zeama de soia (shoyu) era preparată în China de cîteva secole și a fost introdusă și în alte țări din Extremul Orient, mai ales în Japonia, care este acum principala producătoare și unde au fost făcute eforturi însemnate de industrializare și creștere a productivității. Sosul de soia este fabricat dintr-un amestec sărat de boabe de soia și grîu, fermentat de *Aspergillus oryzae* pentru a rezulta koji-ul. Acesta din urmă este amestecat într-un recipient cu un volum egal de soluție sărată din care rezultă moromi-ul, care este fermentat în recipiente mari, timp de 8—12 luni, la temperatură scăzută și amestecat din cînd în cînd. Microbii responsabili cu această fermentație sînt în primul rînd bacteria *Pediococcus soyae*, levurile *Saccharomyces rouxii* și *Torulopsis* spp. Acestea sînt adăugate la moromi sau se înmulțesc pornind de la celulele deja prezente în cel de al doilea. Fermentația îmbogățește produsul în acid lactic, etanol și alți acizi organici. După fermentație, moromi-ul este stors și zeama de soia este extrasă și apoi condiționată, iar ce rămîne este adesea folosit în alimentația animalelor domestice.

Un procedeu elaborat de cercetătorii Oficiului Francez al Cercetării Științifice și Tehnice (ORSTOM) de peste Ocean și ai Institutului Național al Cercetării Chimice Aplicate (IRCHA) consta din îmbogățirea în proteine a produselor amilacee în scopul utilizării lor în alimentația animalelor. Produsul amilaceu fiert (manioc), obținut sub o formă separată, avea un conținut de apă apropiat de 50% și conținea sărurile minerale necesare creșterii unei sușe de *Aspergillus niger*, care era inoculat în mod omogen. Structura granulară și poroasă a substratului permitea o bună răspîndire a oxigenului în masă. Aceasta era invadată progresiv de miceliu, care degrada și asimila amidonul, ansamblul conservînd astfel o consistență solidă, spongioasă și aerată cît ține procesul de transformare. Raimbault (1978) a arătat că rezultatele cele mai bune au fost obținute la o concentrație de 55% făină de manioc și la o temperatură cuprinsă între 35 și 40°C. La început *p*H-ul trebuia să fie destul de scăzut pentru a se evita contaminarea bacteriană; acidificarea rapidă se pro-

ducea pe măsură ce se dezvolta ciuperca; această acidificare era încetinită cu ajutorul unui amestec de sare de amoniu și de uree, care serveau drept surse de azot (cînd 50—60% din azot era furnizat sub formă de uree, p*H*-ul rămînea destul de stabil pentru a permite o creștere optimă). Densitatea inoculării convenabile era de 2×10^7 spori pe gram de făină. Randamentul de transformare a glucidelor în proteine era de ordinul a 20% și era superior celui obținut lichid (18%). Un dispozitiv experimental avînd o capacitate de 40 de litri a permis să fie tratate 8 kilograme de substrat uscat și el era echivalent cu un fermentator lichid de 150 de litri. După 30 de ore de fermentare cu o suș de *Aspergillus niger*, la 38°C, conținutul de proteine al unei reziduu de feculă de cartof urca de la 5 la 18%, iar conținutul de glucide scădea de la 65 la 28%.

Simplitatea și avantajele unui asemenea procedeu (sterilizarea substratului neindispensabil, recolta totală a produsului final, consumul redus de energie, costurile de investiție foarte mici) făceau posibilă conceperea unor instalații de dimensiuni modeste, adaptate la nivelul unui sat sau al unei mici exploatări agricole. Procedeul putea să intereseze țările ecuatoriale producătoare de manioc și alte plante cu tuberculi amilacei care ar face să crească valoarea lor nutritivă.

Cercetările efectuate de ORSTOM și IRCHA, în special în cadrul unui dispozitiv experimental cu o capacitate totală de 1 200 de litri, aveau să verifice validitatea procedeului, să amelioreze cunoștințele tehnice asupra fermentațiilor în mediu solid, să studieze valoarea nutritivă a produsului final pentru alimentarea porcilor și a păsărilor de curte. Pe deasupra, evaluările păreau să indice faptul că, dacă prețul kilogramului de soia atingea 1,20 de franci (ceea ce nu era prea departe de costul din 1979), proteinele obținute pe bază de manioc ar deveni concurente demne de luat în seamă.

La Universitatea din Guelph, din Ontario-Canada, a fost pus la punct un procedeu analog de transformare, într-un fermentator cu o capacitate de 3 000 de litri, a făinii de manioc cu ajutorul unei suș de *Aspergillus niger*, în condiții de aciditate ridicată și la o temperatură de 40°C. O astfel de experiență urma să aibă loc la Centrul Internațional de Agricultură Tropicală (CIAT), în Columbia, în scopul producerii unui aliment, pentru vite, îmbogățit în proteine. Acest program de cercetări a fost lansat în 1972 de Centrul de Cercetări pentru Dezvoltare Internațională (CRDI) în colaborare cu CIAT și Universitatea din Guelph. Specialiștii în microbiologie au utilizat la început suș de *Aspergillus fumigatus* (care prezenta inconvenientul că provoca reacții alergice muncitorilor expuși) cît și un mutant al acestei specii, apoi *Rhizopus chinensis*, dar alegerea lor s-a bazat în final pe o altă ciupercă, *Cephalosporium eichhorniae* 152, care se dezvolta în mediu acid și la temperatură ridicată. Produsul final al transformării manioculuí cu această suș conținea 49% din proteine și era bine acceptat de animalele folosite în experiment. Acest procedeu era simplu, nu prea costisitor, fiabil și adaptat mediului rural. Cercetările aveau ca obiect modificări genetice ale ciupercii pentru ca aceasta să poată degrada materiile celulozice și să poată produce apoi proteine — pornind, de exemplu, de la resturi de banane și de tulpini.

Tehnicile moderne de fabricare a pîinii tind să producă, într-un ritm mai rapid, aluatul gata de copt; fermentația se realizează așadar la o temperatură

superioară (35°C) și aluatul conține mai multă drojdie. Pot fi folosite, de asemenea, sușe de *Saccharomyces cerevisiae* care au dat rezultate mai bune. Aluatul este, în sfîrșit, supus frămîntării mecanice intense, ceea ce influențează asupra structurii lui. Drojdia de bere, care, pînă la mijlocul secolului al XIX-lea provenea din reziduurile de la fabricarea berii, este produsă în uzine unde sușele selecționate sînt cultivate în aerobioză într-un mediu pe bază de melasă.

Bioconversii

Bioconversiile constau în transformarea de către celulele microbiene a unui metabolit într-un compus cu structură asemănătoare. Microorganismele pot astfel să catalizeze numai cîteva etape ale unui proces de sinteză complexă și esențialmente chimică.

Una dintre biconversiile cele mai vechi este cea a alcoolului etilic în acid acetic la fabricarea oțetului. Această biconversie, a cărei bacterie responsabilă este *Gluconobacter suboxydans*, se realiza, probabil, în Babilon, prin anul 5000 i.e.n.

Bioconversiile sînt foarte specifice deoarece se referă la o reacție determinată și un compus cu structură definită (sterospecificitate). Sînt legate de transformarea izopropanolului în acetonă, a glicerolului în dihidroxiacetonă, a L-tirozinei în L-dihidroxifenilalanină (DOPA), a glucozei în acid gluconic, apoi în acid 2-ceto și 5 ceto-gluconic, a sorbitolului în L-sorboză. Bioconversia sorbitolului în sorboză este singura reacție biologică a sintezei chimice a vitaminei C (acid ascorbic).

Sinteza hormonilor steroidici ilustrează în mod spectaculos contribuția metodelor bazate pe bioconversii. La începutul anilor '30, Kendall (Mayo Foundation) și Reichstein (Universitatea din Bâle) au izolat cortizonul din capsulele suprarenale. Zece ani mai tîrziu, Hench (Mayo Foundation) a demonstrat eficacitatea cortizonului în tratarea reumatismului articular acut. Sinteza chimică a cortizonului se realiza în 37 de etape. Prețul unui gram de hormon era de 200 de dolari. Introducerea, în cursul acestei sinteze, a unui atom de oxigen în poziția 11α a nucleului sterol este capitală, deoarece ea determină activitatea fiziologică a moleculei. În 1952, Peterson și Murray (Upjohn Company) au descoperit că o sușă de *Rhizopus arrhizus* putea să hidroxileze progesteronul și să introducă astfel un atom de oxigen în poziția 11α. Progesteronul este unul dintre primii precursori ai cortizonului și, datorită hidroxilării microbiene (realizată în industrie de microbii înrudiți cu *R. arrhizus*, ca *R. nigricans*), sinteza cortizonului se reducea la 11 etape în loc de 37. Prețul de cost al hormonului a fost și el redus la 6 dolari gramul (Demain, 1981). Alte avantaje ale intervenției microbiene erau realizarea fermentației la 37° C, într-un mediu apos și la presiunea atmosferică, în locul condițiilor extreme de temperatură și de presiune care caracterizau sinteza

chimică. Astăzi este cunoscută hidroxilarea oricărui atom de carbon al moleculei steroidice, (fig. 14—17, (v. Sasson, 1970).

Microorganismele puteau fi utilizate de asemenea la prepararea materiilor prime necesare elaborării steroizilor. Aceste materii prime sînt sterolii, care provin din diosgenina rădăcinilor de ignam sau din stigmasterol și din sitosterol extrași din turte de soia. Acești steroli de origine vegtală trebuie să fie supuși clivării unui lanț lateral și mai multe firme farmaceutice estimau că este mai economic să fie folosite microbacterii în acest scop. Anumiți mutanți de micobacterii nu efectuează decît o degradare incompletă a sterolului și produc apoi molecule foarte utile pentru sinteza steroizilor hormonali. Toate aceste perfecționări, mai ales la nivelul recurgerii la agenții microbieni, au avut drept consecință scăderea prețului gramului de cortizon în 1980, aproximativ de patru sute de ori față de prețul inițial din anii '30. Rezulta o creștere a producției industriale, și aceasta cu atît mai mult cu cît au fost descoperite noi utilizări clinice pentru steroizi

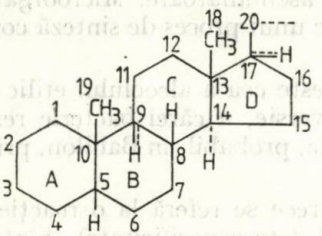
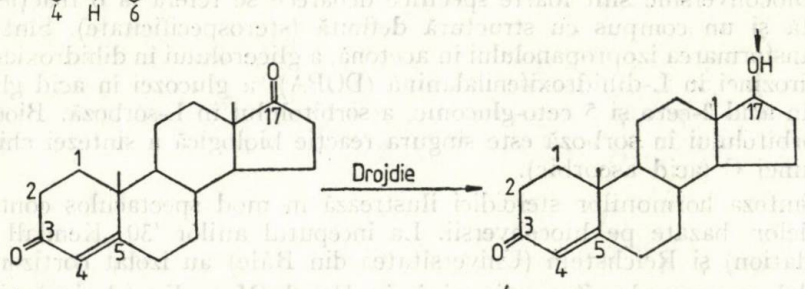
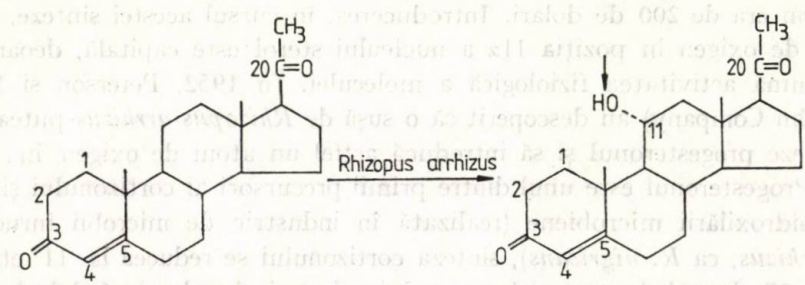


Fig. 14. Nucleu de steroizi (ciclopentenoperhidrofenantrenă substituită).



Δ^4 - Androsten - 3,17 - dionă
Androstendionă

Δ^4 - Androsten - 3 - one - 17 - ol
Testosteron



Δ^4 - Pregnen - 3, 20 - dionă
Progesteron

11∝ - Hidroxiprogesteron

Fig. 15. Transformarea 17-cetosteroizilor în 17-β-hidroxisteroizi și hidroxilarea în poziția 11 a steroizilor (progesteron) de către microorganisme.

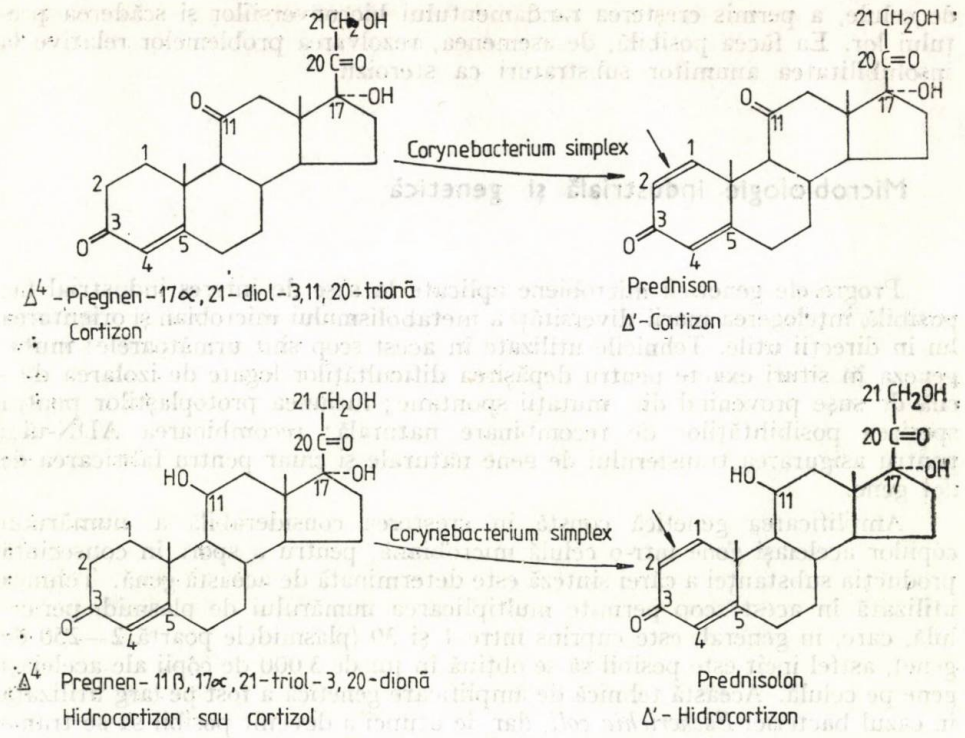


Fig. 16. Dehidrogenarea steroizilor (cortizon şi hidrocortizon) de către microorganisme.

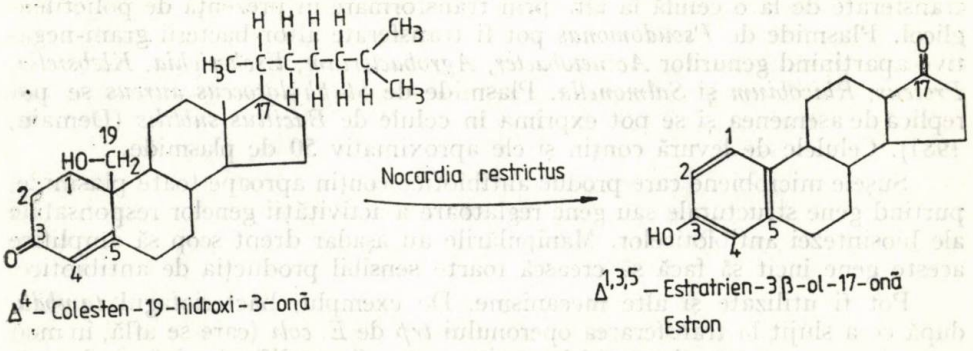


Fig. 17. Sinteza estronului de către *Nocardia restrictus*.

(substanţe anticoncepţionale, tratamente ale insuficienţelor hormonale, ale maladiilor pielii, ale alergiilor şi inflamaţiilor). În 1978, vînzările în întreaga lume ale celor patru steroizi principali (aldosteron, cortizon, prednison, prednisolon) au totalizat aproape 300 de milioane de dolari (în Scientific American, 1981).

Bioconversiile necesită uneori intervenţia culturilor mixte sau succesiunea de suşe sau specii microbiene capabile să realizeze o etapă specială a bioconversiei. Folosirea celulelor imobilizate, mai stabile decît enzimele sau culturile

de celule, a permis creşterea randamentului bioconversiilor şi scăderea preţului lor. Ea făcea posibilă, de asemenea, rezolvarea problemelor relative la insolubilitatea anumitor substraturi ca steroizii.

Microbiologie industrială şi genetică

Progresele geneticii microbiene aplicate la suşe de interes industrial fac posibilă înţelegerea marii diversităţi a metabolismului microbian şi orientarea lui în direcţii utile. Tehnicile utilizate în acest scop sînt următoarele: mutageneza în situri exacte pentru depăşirea dificultăţilor legate de izolarea dificilă de suşe provenind din mutaţii spontane; fuziunea protoplaştilor pentru sporirea posibilităţilor de recombinare naturală; recombinarea ADN-ului pentru asigurarea transferului de gene naturale şi chiar pentru fabricarea de noi gene.

Amplificarea genetică constă în creşterea considerabilă a numărului cópiilor aceleiaşi gene într-o celulă microbiană, pentru a spori în consecinţă producţia substanţei a cărei sinteză este determinată de această genă. Tehnica utilizată în acest scop permite multiplicarea numărului de plasmide per celulă, care, în general, este cuprins între 1 şi 30 (plasmidele poartă 2—250 de gene), astfel încît este posibil să se obţină în jur de 3 000 de cópii ale aceleiaşi gene pe celulă. Această tehnică de amplificare genetică a fost pe larg utilizată în cazul bacteriei *Escherichia coli*, dar de atunci a devenit posibil să se transfere o genă cromozomică sau un grup de gene în plasmide, apoi să se introducă aceasta din urmă într-un colibacil. Mai mult, plasmide de *Bacillus* pot fi transferate de la o celulă la alta prin transformare în prezenţă de polietilenglicol. Plasmide de *Pseudomonas* pot fi transferate altor bacterii gram-negative aparţinînd genurilor *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Rhizobium* şi *Salmonella*. Plasmide de *Staphylococcus aureus* se pot replica de asemenea şi se pot exprima în celule de *Bacillus subtilis* (Demain, 1981). Celulele de levură conţin şi ele aproximativ 50 de plasmide.

Suşele microbiene care produc antibiotice conţin aproape toate plasmide, purtînd gene structurale sau gene reglatoare a activităţii genelor responsabile ale biosintezei antibioticelor. Manipulările au aşadar drept scop să amplifice aceste gene încît să facă să crească foarte sensibil producţia de antibiotice.

Pot fi utilizate şi alte mecanisme. De exemplu, bacteriofagul *lambda*, după ce a slujit la transferarea operonului *trp* de *E. coli* (care se află, în mod normal, pe cromozomul acestei bacterii), putea fi amplificat pînă cînd enzimele biosintezei triptofanului reprezentau 50% din proteinele celulare solubile (Demain, 1981). Un rezultat analog poate fi obţinut ca urmare a amplificării acestui operon *trp* transferat de o plasmidă şi nu de un bacteriofag *lambda*. Studii de acest tip aveau ca obiect creşterea, între altele, a producţiei prolinei, biotinei, riboflavinei, sau penicilin-acilazei.

Recombinarea omoloagă are loc între cromozonii unor bacterii sau a celulelor eucariote ce au secvenţe nucleotidice de ADN asemănătoare şi care se împerechează pentru a face schimb de fragmente de ADN, ceea ce necesită secţionarea moleculelor de ADN apoi sudarea lor. Această recom-

binare omoloagă este extrem de eficace pentru a genera noi genotipuri sau noi configurații de informație genetică. Dacă doi indivizi diferă prin n gene sau segmente de gene, recombinarea între ansamblurile lor de gene va putea genera 2^n genotipuri noi. Conjugarea între indivizii aparținînd la două sușe microbiene ai căror ADN se deosebesc printr-o duzină de perechi din miliarde de nucleotide poate genera 2^{12}, aproape 5 000 de noi genotipuri. Deși majoritatea microorganismelor sînt capabile să schimbe gene între sușe înrudite, există puține exemple ale unei exploatări a posibilităților oferite de recombinarea genetică naturală pentru a izola sușe performante și posedînd caractere care provin din mai multe sușe. Anumite levuri industriale se află totuși în acest caz.

În timp ce recombinarea omoloagă permite schimbul de fragmente de ADN cu compoziții asemănătoare, alte forme de recombinare au ca efect adăugarea ADN-ului nou la genomul microorganismului. Este cazul transferului plasmidelor sau al experiențelor de recombinare de acizi dezoxiribonucleici diferiți.

Ameliorarea proceselor de fermentație ar putea fi astfel realizată datorită transferului în celule bacteriene al genelor care determină sinteza amilazelor de la *Aspergillus*, al glucoamilazei de la *Aspergillus* sau *Rhizopus*, al glucoz-izomerazei de la *Streptomyces* sau al reninei de *Mucor*; producerea acestor enzime ar fi mai economică și procesele de fermentație mai eficace.

Aceste tehnici sînt folosite de asemenea pentru ameliorarea proprietăților sușelor de *S. cerevisiae* utilizate la fabricarea berii. Astfel s-a încercat să se introducă în aceste sușe genele unei specii asemănătoare, *Saccharomyces diastaticus*, care îi conferă proprietatea de a fermenta dextrinele. Într-adevăr, glucidele conținute în lichidul provenind din malț conțin 53% maltoză, 12% glucoză, 13% maltotrioză, 22% dextrine și urme de maltotetraoză. Sușele de drojdii sînt capabile să fermenteze toate aceste zaharuri, cu excepția dextrinelor. Creșterea cererii în favoarea unei beri „ușoare", adică avînd o concentrație mai slabă de glucide, a condus la cercetarea unor sușe în stare să fermenteze dextrinele mustului și să reducă astfel concentrația finală a zaharurilor în bere. Mai multe teste de introducere a genelor de *S. diastaticus* au permis izolarea sușelor capabile să fermenteze dextrinele, dar berea astfel produsă avea un gust neplăcut, datorat prezenței 4-vinil guaiacolului, sintetizat de drojdie din must. Tubb și colaboratorii săi (Brewing Research Foundation, din Marea Britanie) au arătat că transferul genelor fermentației dextrinelor de *S. diastaticus* era însoțit de cel al genelor implicate în sinteza acestui compus fenolic, dar nu în mod sistematic. Devenea, așadar, posibilă realizarea unicului transfer al genelor de fermentație a dextrinelor de la o specie de drojdie la alta; această operație era, probabil, în domeniul producerii băuturilor și alimentelor fermentate, prima dintr-o serie de lucrări destinate obținerii unor produse de o calitate și un gust specifice. În plus, introducerea genelor amilazei și glucoamilazei în celulele de *S. cerevisiae* ar avea drept consecință crearea posibilității ca drojdia să producă în mod direct alcool din amidon.

O contribuție extrem de remarcabilă pe care tehnicile de recombinare genetică au adus-o producerii industriale de aminoacizi este biosinteza metioninei. În 1980 erau produse pe cale chimică 5 000 de tone de metionină. Metodele de inducție și selecție de mutanți care sintetizează mari cantități

de metionină nu au dat rezultate edificatoare, dar geneticienii intenționau să introducă în microorganisme genele corespunzătoare noilor căi metabolice de sinteză și mecanismelor de reglare a acestora din urmă. Ar putea fi, de asemenea, proiectată, în locul producerii doar a metioninei, producerea unei proteine bogate în acest aminoacid, care ar fi, oricum, mai plăcută la gust decît metionina (adăugarea acesteia dă, într-adevăr, un gust amar.).

În cazul antibioticelor, operonii responsabili cu sinteza lor ar putea fi transferați din sușe de streptomicete cu creștere lentă în bacterii cu creștere rapidă (*E. coli* sau *B. subtilis*), ceea ce ar spori considerabil producția de antibiotice, datorită mai ales unui control mai bun al condițiilor de cultură. Cercetări recente au arătat că genele structurale ale mai multor antibiotice sînt în general grupate pe cromozomul microbilor respectivi, astfel încît este posibil să fie încorporate în plasmide și să fie transferate în alte actinomicete sau în *E.coli*. Aceste plasmide erau elaborate pornind de la plasmidele SLP 1.2 de *S. lividans* și SCP2 de *S. coelicolor*; pătrunderea lor se făcea mai ales în protoplaști de *Streptomyces*. Pe de altă parte, bacteriofagul temperat C31 de *Streptomyces* a putut fi asociat cu plasmida pBR 322 de *E. coli* și acest replicon bifuncțional se reproducea ca un bacteriofag în celulele de *Streptomyces* și ca o plasmidă în cele ale colibaciului (în Demain, 1981).

Fuziunea de protoplaști, urmată de recombinare genetică, a fost obținută în cazul ciupercilor, folosindu-se polietilenglicol: între *Penicillinium chrysogenum* și *P. cyaneofulvum*, între *Aspergillus nidulans* și *A. rugulosus*, între mai multe specii de streptomicete (la care frecvența de recombinare putea atinge 10^{-2}—10^{-1}) și chiar între două genuri de levură, *Candida* și *Endomycopsis* (Demain, 1981). Aria acestor recombinări ar putea fi mai mult lărgită, ca urmare a descoperirii că iradierea protoplaștilor de *Streptomyces* cu raze ultraviolete înaintea fuziunii avea ca efect înzecirea frecvenței de recombinare. Fuziunea de protoplaste face posibilă ameliorarea anumitor sușe utilizate în industrie și care au avut de suferit datorită procesului de selecție; era într-adevăr posibilă fuzionarea lor cu sușe din aceeași specie, mai viguroase, dar mai puțin performante. Fuziunea dintre două sușe de *Streptomyces* putea să dea și celule hibride, dintre care una din cinci prezenta o nouă combinație a genelor extrem de interesantă pentru producerea antibioticelor. Acesta ar fi un mijloc rapid de a reuni dintr-o dată grupurile de gene reperate ca urmare a laborioaselor operații succesive de mutație și de selecție.

La *Nocardia lactamdurans*, două sușe care produc cefamicina au fost ameliorate, apoi fuzionate una cu cealalată pentru a da recombinanți, dintre care unii se caracterizează printr-o producție de antibiotice cu 10—15% mai mare decît cea a liniei parentale cea mai eficace. Fuziunea celor două specii de *Streptomyces* a dat un recombinant care sintetiza o nouă antraciclină în timp ce mutanți de *Nocardia mediterranei* care nu produceau rifamicină au fost fuzionați pentru a da sușe care sintetizează trei noi rimaficine (Demain, 1981).

Anumite sușe de *Saccharomyces cerevisiae* utilizate în producerea de băuturi și alimente fermentate pot să producă spori sexuați și pot fi astfel folosite în unele experiențe de selecție a sușelor bazate pe hibridare. Astfel de experiențe empirice au contribuit la ameliorarea sușelor de drojdie de panificație.

Producerea de proteine cu ajutorul unor organisme monocelulare

Producerea de proteine din hidrocarburi

Cultura de microorganisme pe scară largă pentru obținerea proteinelor microbiene care pot fi consumate de om sau de animalele domestice a fost proiectată ca o soluție a penuriei alimentare ce domnea în Germania în timpul primului război mondial. La Berlin, Delbrück și colaboratorii săi au pus atunci la punct primele procedee de cultivare pe scară largă a drojdiei de bere (*Saccharomyces cerevisiae*), care era încorporată mai ales în supe și cîrnați. Unele levuri (*Candida arborea* și *C. utilis*) și-au adus o contribuție substanțială la regimul alimentar al germanilor în timpul celui de-al doilea război mondial (în Scientific American, 1981).

În cursul anilor '60, expresia „proteine monocelulare" (POU), sau single-cell proteins (SCP), a fost utilizată pentru prima oară pentru a desemna produșii de origine microbiană provenind din cultura în masă de levuri sau de bacterii, destinată alimentației umane sau animale. Numeroase articole atrag mai ales atenția lumii științifice și publicului asupra posibilității de a obține aceste proteine prin cultivarea microorganismelor pe hidrocarburi.

Acest entuziasm referitor la proteinele de origine microbiană nu a fost împărtășit de marile companii petroliere, a căror reticență se baza pe creșterea însemnată a prețurilor petrolului în 1973. Cu toate acestea, în 1974, se constata o creștere a interesului care se explica prin progresele tehnice înregistrate în procedeele de fabricație, dar și prin rezultatele experiențelor de nutriție efectuate cu proteinele produse, precum și prin noile perspective ale comercializării lor.

Toate levurile folosesc drept sursă de azot sărurile amoniacale sau mai rar nitrații. Conversia azotului mineral în proteine și asimilarea diverselor substraturi organice ca surse de carbon stau la baza utilizării levurilor pentru producerea industrială de proteine.

British Petroleum (BP) a manifestat interes, către sfîrșitul anilor '50, pentru producerea de biomasă microbiană din hidrocarburi, ca urmare a cercetărilor lui Champagnat, la Lavéra. Justificarea proiectului inițial putea fi, pe lîngă producerea de proteine, deparafinarea motorinei. Într-adevăr, petrolul brut care era rafinat la Lavéra conținea 10—25% parafine. Acestea erau degradate de o levură din genul *Yarrowia* [1] *(Candida)*, în fermentatoare în care era injectat amoniac, ce servea drept substrat azotat și menținea *p*H-ul în mediul nesteril; după faza de creștere activă, levura era recoltată și motorina reziduală era eliminată, la fel și lipidele, care reprezentau aproximativ 10% din biomasă. Deoarece acest procedeu dădea un subprodus care trebuia din nou rafinat, operațiunea era necesar să se desfășoare aproape de o rafinărie

[1] *Candida lipolytica*, izolată inițial din margarină în Olanda, a fost descrisă în 1928 sub numele de *Torula lipolytica*, apoi *Yarrowia* rebotezată *Saccharomycopsis lipolytica*. Această levură oxidează hidrocarburile în acizi grași cu ajutorul hidroxilazelor; acești acizi grași sînt apoi degradați în acetil-coenzima A, care este transformată în substanță celulară.

de petrol. Uzina din Lavéra avea, în 1976, o capacitate de producție de 20 000 de tone pe an și funcționa, așadar, cu motorină ca substrat. Produsul a fost comercializat sub numele de Toprina.

La sfîrșitul anului 1975 a intrat în funcțiune la Sarroch, în Sardinia, prima uzină de mare capacitate aparținînd firmei British Petroleum, care se asociase cu o companie italiană pentru a forma societatea Italproteine; în această uzină, cu o capacitate de producție de 100 000 de tone pe an, era utilizat un procedeu diferit de cel de la Lavéra, deoarece levurile metabolizau *n*-parafine și nu motorina. Tehnica a fost pusă la punct într-o altă unitate aparținînd lui BP, din Grangemouth, Scoția. Erau folosite fermentatoare în care mediul era agitat și conținea *n*-parafine purificate; producția de proteine POU era de ordinul a 4 000 de tone pe an. Compania italiană Liquichimica a construit, la Saline di Montebello în Calabria, o uzină care producea și proteine cu ajutorul levurilor din *n*-parafine, cît și din aminoacizi, acizi grași, și acid citric; tehnologia era japoneză și capacitatea de producție era de 200 000 de tone pe an în 1980.

Japonia a arătat din nou interes, începînd din 1975, pentru acest tip de uzine și a contribuit la construirea unei unități de producție de 60 000 de tone pe an, în România (Roniprot); în 1980, în această țară funcționau opt uzine și produceau fiecare pe an cîte 1 500 de tone de proteine pornind de la deșeuri industriale.

În S.U.A., interesul purtat acestei ramuri a industriei alimentare în anii '60 a scăzut după aceea, probabil din cauza situației agricole nord-americane; dar, după 1975, se acorda din nou o atenție deosebită producției de proteine pornind de la alte substraturi decît *n*-parafine și anume de la metanol și celuloză.

Producerea de proteine pe bază de alte substraturi

Importanța producției de gaz natural din zăcămintele Mării Nordului a determinat Societatea Shell să proiecteze utilizarea acestui substrat, ca materie primă pentru elaborarea de proteine POU. Acest gaz este practic metan în stare pură și, cum petrochimia se bazează mai ales pe etilenă, el nu poate servi decît ca furnizor de hidrogen pentru sinteza de amoniac. Pentru ca amestecul de aer și metan să nu ia foc, metanul este transformat prin oxidare în metanol, care este adevăratul substrat pentru producerea de proteine de origine microbiană. Către mijlocul anului 1973, compania Shell și-a întrerupt lucrările asupra utilizării metanolului ca substrat și a pus la punct un procedeu de cultură microbiană mixtă pe metan, ceea ce însemna că mediul conținea un microorganism dominant și alte cîteva cu rol de convivi sau simbioți. Temperatura mediului, 42°C, făcea posibilă eliminarea unui număr de contaminanți bacterieni (Sherwood, 1974).

S-au produs proteine POU pornind de la metanol ca sursă de carbon în uzinele firmei Hoechst AG în RFG și în uzinele aparținînd societății Imperial Chemical Industries (ICI) în Marea Britanie. Sub egida Koweit Institute for Scientific Research se proiecta, de asemenea, producerea de proteine de organisme monocelulare folosind metanolul ca substrat. În 1982, cultura de levuri în acest scop era realizată într-o uzină pilot.

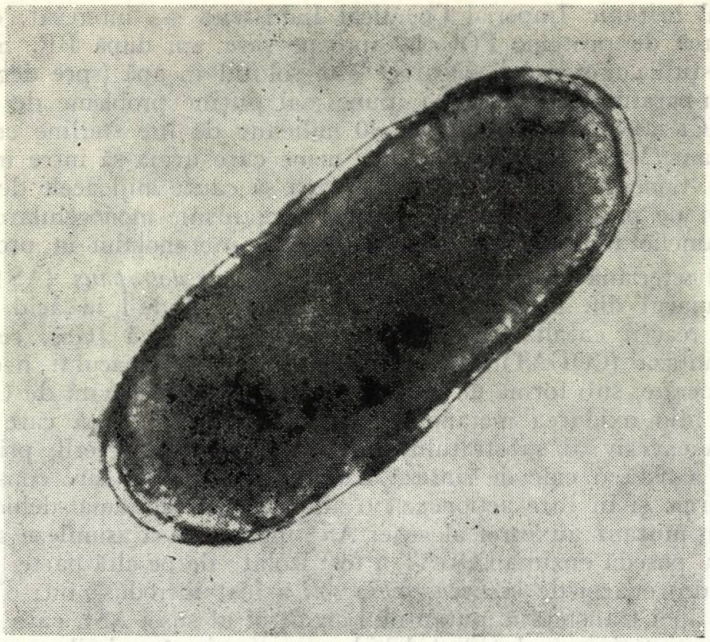
Grupul britanic Imperial Chemical Industries s-a interesat, din 1968, de fabricarea de proteine POU la aproape șase ani după BP. Substratul ales îl constituia metanolul, deoarece este solubil în apă (spre deosebire de metan și n-parafine) și, de aceea, pune mai puține probleme de inginerie. În 1976, ICI a consacrat suma de 40 milioane de lire sterline construirii, la Billingham (Marea Britanie), a unei uzine care urma să intre în producție în 1980. Concurența soiei a obligat firma să caute mijloacele de reducere a prețurilor de producție a proteinelor de organisme monocelulare, în special prin ameliorarea eficacității transformării metanolului în proteină.

Sușa bacteriană utilizată, *Methylophilus methylotrophus* (AS1), asimilează amoniacul din mediul de cultură transformîndu-l în acid glutamic prin două reacții catalizate, una de glutamin-sintetază (GS), cealaltă de glutamat-sintază (COGAT). Această asimilare a amoniacului necesită un aport de energie, sub formă de ATP, pentru reacția catalizată de GS; ATP-ul provine din oxidarea metanolului în gaz carbonic după care urmează un consum excesiv al substratului carbonat. La alte bacterii, printre care colibacilul, există o cale de sinteză a acidului glutamic care consumă mai puțină energie și în care acționează o altă enzimă, glutamat-dehidrogenaza (GDH). Un mutant auxotrof al sușei AS1 incapabil să asimileze amoniacul deoarece nu posedă enzima COGAT a fost izolat; de pe altă parte, gena glutamat-dehidrogenazei de la *Escherichia coli* a fost introdusă într-o plasmidă și clonată, apoi transferată mutantului auxotrof al sușei ASI, care a devenit capabil să sintetizeze glutamat-dehidrogenaza și să asimileze amoniacul datorită acestei enzime, consumînd deci mai puțină energie (Gelfand, 1980, în Demain, 1981). Un cîștig de energie, oricît de mic, reprezintă o însemnată economie la scara producerii masive de proteine cu ajutorul lui *Methylophilus methylotrophus*. Au fost efectuate studii toxicologice asupra noii sușe, care avea să fie folosită în noua uzină numai după 1985 cu un randament aproape de cel optim. O asemenea experiență arată că uzina trebuia să fie construită pe baza microorganismului cultivat în masă și nu invers. Capacitatea de producție a acestei uzine era de 50 000 de tone pe an (1983) și produsul era comercializat sub numele de Pruteen.

Producția firmei germane Hoechst AG, care utiliza aceeași suș bacteriană ca și ICI, era de numai 1 000 de tone în 1982, în plus procedeul folosit făcea posibilă eliminarea tuturor substanțelor toxice.

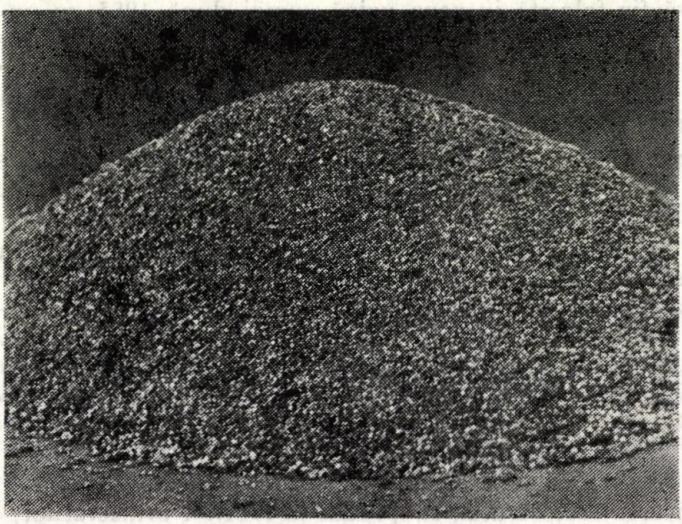
Un alt procedeu consta în utilizarea ca substrat a reziduului unei activități industriale. Este cazul reziduurilor sulfitate ale uzinelor de pastă de hîrtie, care au făcut posibilă producția de levură în S.U.A. S-a observat totuși, un declin al acestei fabricații, deoarece tehnica pe bază de sulfit era înlocuită treptat de procedeul Kraft. Cu toate acestea, Finlanda a construit în 1975, lîngă Jamsankoski, o uzină în care o ciupercă (*Paecilomyces*) era cultivată pe reziduurile sulfitate (10 000 de tone de proteine pe an). Pe de altă parte, uzina din Tapella comercializa în 1980 un produs cu numele Pekilo.

Valorificarea lactoserului, subprodus al fabricii brînzeturilor, constă mai ales în utilizarea lui ca substrat pentru producerea de levuri (v. pag. 221) În Franța, trei unități cu o capacitate de 6 000 de tone pe an furnizau, în 1979, proteine pentru alimentația umană și animală. A fost proiectată o construcție a două alte uzine de 10 000 de tone pe an fiecare.



Microfotografie electronică a suşei AS1 de *Methylophilus methylotrophus*. × 96 000

[Foto: Imperial Chemical Industries, Agricultural Division, Billingham, Cleveland, Marea Britanie.]



Produs fabricat pe bază de proteine ale bacteriei *Methylophilus methylotrophus* în uzina din Billingham a grupului britanic Imperial Chemical Industries şi comercializat sub numele de Pruteen.

[Foto: Imperial Chemical Industries, Agricultural Division, Billingham, Cleveland, Marea Britanie.]

Tot în Franța, o firmă din Pau a pus la punct un procedeu de cultură de levuri pe bază de manioc. Levura utilizată, *Candida tropicalis*, era înrudită cu cele cultivate în instalațiile firmei British Petroleum, astfel încît se profita de pe urma tehnicilor deja elaborate cît și de rezultatele testelor nutriționale și toxicologice care fuseseră efectuate pe proteinele extrase din această levură. Aceasta se dezvolta pe amidonul nehidrolizat, cu perioade de creștere de aproximativ o oră, ceea ce înseamnă că se puteau obține, într-o oră, îmbogățiri de levură de 20—30%. La sfîrșitul operațiunii, manioc-ul avea un conținut de proteine de 19%, cu o compoziție satisfăcătoare de lizină (7,7%) și de aminoacizi sulfurați (2,7% metionină și 2% cisteină).

În Cuba, au fost construite, în 1979, 12 unități de mare capacitate pentru producția de levuri cultivate pe melase sau reziduuri de distilerie.

U.R.S.S. era, în 1980, cea mai mare producătoare de proteine de organisme monocelulare. După Carter (1981) această producție era de ordinul a ~1 000 000 de tone pe an. Cercetările lui Carter (1981) au permis localizarea a 107 uzine, dintre care cel puțin 86 produceau proteine monocelulare, celelalte 21 fabricînd o mare varietate de compuși de origine microbiană, cum ar fi lizina și alți aminoacizi, zaharuri, vitamine, lipide, enzime și antibiotice care erau adăugate furajelor.

În ceea ce privește materiile prime ale acestor uzine, Carter (1981) a găsit date despre 56 de uzine din 86. Majoritatea (49) utilizau deșeuri de origine agricolă, forestieră și industrială. Printre uzinele de mici dimensiuni multe aparțineau categoriei vechii industrii a hidrolizei ligninei (extracția de rășini, de furfurol, producerea de cărbune de lemn, fermentarea produșilor de hidroliză). Multe din aceste uzine au fost reconstruite și instalații de mare capacitate au fost edificate în vederea producerii de proteine. Materiile prime utilizate erau talașul și pasta de lemn, rumeguș, precum și leșii bisulfitice provenite din industria hîrtiei. Printre deșeurile provenite din agricultură cele mai des folosite erau cojile semințelor de floarea-soarelui, deșeurile de la decorticarea orezului, resturile știuleților de porumb, resturile lemnoase din prelucrarea trestiei de zahăr și melasele. Turba hidrolizată putea fi de asemenea de mare interes: într-o lucrare publicată în 1977 (Carter, 1981) s-a arătat că era proiectată construcția a 98 de uzine pentru producerea unui număr de 1 965 000 de tone de proteine pe an, pornind de la turba extrasă din vastele zăcăminte ale U.R.S.S. În total, materiile prime care nu erau hidrocarburi se aflau la baza a peste jumătate din producția de proteine. Hidrocarburile ar putea fi utilizate într-un mod mai eficace, iar publicațiile sovietice confereau tot atîta importanță exploatării viitoare a materiilor prime hidrocarbonate ca și celei a materiilor nehidrocarbonate.

Cultura de cianobacterii și alge marine

Cultura masivă de alge verzi este practicată în cîteva țări, dar, spre deosebire de bacterii și levuri, nu poate fi vorba decît despre o producție discontinuă, deoarece ea rezultă din fotosinteză; ea variază în funcție de condițiile de iluminare și pentru ea sînt necesare importante suprafețe de apă. Cianobacteriile oferă, în schimb, în anumite condiții naturale, perspective interesante, deoarece unele specii sînt capabile să fixeze azotul at-

mosferic, ca de exemplu spirulina.

În 1521, Bernal Diaz del Castillo a semnalat vînzarea, pe piața mexicană, a biscuiților numiți *tecuitlatl* și formați din filamente uscate de *Spirulina maxima*. Această cianobacterie creștea atunci în apele foarte alcaline ale lacului Texcoco, lîngă Mexico, așa cum crește și azi. Francisco Hernandez, medic și naturalist, care îi însoțea pe primii conchistadori, a descris modul în care filamentele de spirulină erau recuperate din apele lacului, apoi uscate pentru a da biscuiții „de culoare albastră sau verde".

În 1964, un botanist belgian, J. Léonard, care participa la expediția belgiană transsaharianā, a remarcat în mai multe piețe din satele din Kanem, în Ciad, pesmeții „de culoare albastră-verde", sau dihé, provenind din bălțile apelor alcaline care înconjurau lacul Ciad, pesmeți care erau consumați de populațiile locale. Examenul microscopic a arătat că erau constituiți dintr-o singură specie de spirulină, *Spirulina platensis*. Analizele efectuate la întoarcerea expediției în Belgia de către Léonard și Compére au permis evidențierea conținutului foarte ridicat de proteine (aproximativ 70% din greutatea materiei uscate) al acestor pesmeți.

Astfel, două populații autohtone, aflate la o distanță de 10 000 de kilometri au descoperit proprietățile nutritive ale spirulinelor. Apele lacului Texcoco și bălțile care înconjoară lacul Ciad sînt foarte alcaline (*p*H aproximativ 11), spirulinele proliferează la acest *p*H și formează o monocultură; prezența vacuolelor gazoase în celule și forma spiralată a filamentelor permit acestora din urmă să plutească și să formeze îngrămădiri, pe care vîntul le poartă spre malurile lacului. Uscarea se face rapid la soare.

Analizele efectuate la Institutul Francez al Petrolului, cît și în Italia, Japonia și Mexic, pe eșantioane de spiruline cultivate în laborator sau recoltate în condiții naturale au confirmat datele cercetătorilor belgieni: 65% proteine (mult mai mult decît soia), 19% glucide, 6% pigmenți, 4% lipide, 3% fibră și 3% cenușă. Proteinele aveau o compoziție de aminoacizi echilibrată; conținuturile de metionină, triptofan și alți aminoacizi erau asemănătoare sau superioare celor ale cazeinei; proteinelor spirulinei le lipsea totuși, lizina. Digerarea filamentelor de spirulină care nu au un perete cu compoziție chimică comparabilă celei a algelor eucariote (*Chlorella*, *Scenedesmus*), se făcea ușor. În plus, concentrația în acizi nucleici (4%), superioară concentrației medii a vegetalelor superioare (1—2%), dar inferioară celei a algelor eucariote (5—6%), este foarte mult sub cea a levurilor (10%) care servesc la fabricarea proteinelor POU cele mai curente.

Regimurile pe bază de spiruline (100% proteine în rația alimentară) au dat la mai multe specii de animale rate de creștere comparabile celor ale regimurilor obișnuite. La animalele hrănite nu s-au constatat anomalii și nici efecte patologice. Spirulina este și o sursă de ribuloză difosfat carboxilază, care este o enzimă prezentă la toate organismele fotosintetizante și care este obiectul unei atenții deosebite pentru că ea ar putea să contribuie la alimentația protidică a omului.

După cercetările făcute, în 1967, în colaborare cu Institutul Francez al Petrolului, Întreprinderea mexicană Sosa Texcoco recolta spirulinele de pe o suprafață de aproximativ 900 de hectare din lacul Texcoco, ale cărui depuneri de sare erau exploatate din 1936. Biomasa spirulinelor se dubla în 3-4 zile și recoltarea se făcea ziua și noaptea. O dată filtrată, suspensia

de spiruline era uscată cu aer cald și transformată într-o pudră fină. Prima uzină-pilot, care producea 150 tone de făină de spirulină pe an, a început să funcționeze în 1973. Producția ei a ajuns după aceea la 500 de tone pe an. Sosa Texcoco a investiti aproape cinci milioane de dolari din 1977 pentru a rezolva problemele tehnologice în raport cu creșterea producției precum și pentru a realiza testele de toxicitate indispensabile înainte de comercializarea produselor. În 1982, producția urma să atingă 1 000 de tone, în valoare de circa 15 milioane de dolari, care reprezentau o treime din cifra de afaceri realizată de companie la fabricarea sodei pulbere din depunerile lacustre.

Principalele importatoare de făină de spirulină mexicană erau Japonia, S.U.A. și țările europene. Întreprinderea Sosa Texcoco producea comprimate și capsule din această făină, adăugînd vitamine A și C, conform normelor cerute de țările importatoare. Se mai exporta făină brută și în S.U.A. În 1982, nouă companii americane specializate în comercializarea concentratelor de proteine și de alimente dietetice urmau să importe 300 de tone de făină de spirulină. În Mexic, Sosa Texcoco comercializa comprimate și capsule analoage celor care erau exportate. Vînzarea se făcea mai ales în magazinele de alimentație dietetică. Compania mexicană furniza de asemenea făină de spirulină unor instituții guvernamentale însărcinate cu ameliorarea stării de nutriție a populației și care utilizau această pudră în prepararea biscuiților și a altor dulciuri cu conținut mare de proteine.

În Israel, 12 000 de metri pătrați de mlaștini au fost amenajați pentru cultivarea de *Spirulina platensis* (Hills Koor Algae Production Ltd., la Haifa); producția totală, în 1982, urma să atingă 50 de tone de spirulină uscată, utilizată în alimentația animalelor și a omului.

În Italia urma să fie construită o uzină pentru cultura de spiruline pe o suprafață de două hectare, într-un sistem închis, constituit din tuburi de polietilenă. Acestea funcționează ca niște colectoare de energie luminoasă și astfel este extins timpul de producție; în plus, sistemul închis permite evitarea contaminăriilor exogene. Experiențe efectuate la Florența au arătat că multiplicarea spirulinelor în lacuri și mlaștini se desfășura din iulie în septembrie, în timp ce în tuburi ea avea loc din aprilie pînă la jumătatea lunii noiembrie (Ciferri, 1981). Randamentele erau ridicate în condiții optime de creștere: pînă la 20 de grame de materie uscată pe metru pătrat pe zi. Randamentele anuale erau de zece ori mai mari decît cele ale grîului, iar randamentele de proteine erau, de asemenea, de zece ori mai mari decît cele ale soiei (Ciferri, 1981):

	Randament (t/ha/an)	
	Materie uscată	Proteine brute
Grîu	4	0,5
Porumb	7	1
Soia	6	2,4
Spirulină	50	35

Ameliorarea sușelor de *Spirulina* putea să sporească și mai mult aceste randamente. Ciferri (1981) a obținut, de exemplu, mutanți de *S. platensis* ale căror acumulări intracelulare de anumiți aminoacizi puteau fi de 40 de

ori mai mari decît cei ai suşei sălbatice şi care prezentau aceeaşi viteză de creştere ca acestea din urmă. În Mexic, cercetările făcute de Sosa Texcoco vizau să izoleze suşe cu genom modificat, capabile să crească în medii alcaline variate şi în condiţii artificiale. Producţia de spiruline putea să atingă astfel 10—20 de tone la hectar.

În Japonia, alimentaţia crapilor ornamentali cu spiruline a avut ca efect o coloraţie deosebit de frumoasă, datorată carotenoidelor conţinute de alge. În 1973, o unitate-pilot de cultură a fost construită într-o insulă din sudul Taiwanului, spirulinele produse servind în alimentaţia găinilor, cărora le colorau gălbenuşul ouălor (în loc să fie folosiţi pentru aceasta produşi de sinteză costisitori). Pigmenţii albaştri (phycocyanine) ai spirulinelor ar putea fi folosiţi, de asemenea, în industria alimentară deoarece acest tip de colorant este destul de rar în produsele naturale. Cercetătorii Institutului Francez al Petrolului continuau să se intereseze de aplicaţiile practice ale spirulinelor şi în acest scop păstrau un bazin de cultură într-o staţiune a Institutului Naţional al Cercetării Agronomice, din Martinica unde condiţiile climatice sînt foarte favorabile.

Spirulinele pot fi cultivate în mlaştini cu ape alcaline, în apele încălzite de efluenţii centralelor termice (care produc şi aburi bogaţi în oxid de carbon), fără să facă totuşi concurenţă altor microorganisme, mai exigente pe plan ecologic.

În R.S.S Uzbekistan, în 1979, existau 400 de eleştee unde erau cultivate alge verzi mezofile şi termofile, pentru producerea de alimente pentru vite, păsări de curte şi viermi de mătase. Suspensiile de alge au servit şi în încercările de fertilizare a cîmpurilor de bumbac. Randamentele variau între 30 şi 60 de tone de materie uscată la hectar pe an, factorul limitator fiind temperaturile de iarnă destul de scăzute (2 . . . 5°C), în ciuda unei iluminări abundente. Lîngă Samarkand, o uzină producea o tonă de masă celulară pe zi, şi urmau să fie construite şi alte uzine. Erau efectuate experienţe de cultură masivă cu cianobacterii şi plante acvatice (*Lemna*).

Valoarea nutritivă şi viitorul proteinelor de origine microbiană

Ţările Comunităţii Economice Europene utilizau, în 1974/75, aproximativ 13—15 milioane de tone de proteine vegetale pe an pentru alimentaţia şeptelului lor. Acest consum urma să atingă cifra de aproape 25 milioane de tone pe an în 1985. Era vorba mai ales de proteine furnizate de soia, importată din America de Nord şi Sud, şi al căror consum a sporit în mod rapid (931 000 de tone în 1974 şi 2 140 000 de tone în 1977). Deoarece preţurile soiei au crescut foarte mult — ca şi cele ale făinii de peşte, ca urmare a declinului pescuitului de sardele în largul coastelor peruviene, alimentaţia animalelor de producţie era foarte costisitoare.

Cu titlu comparativ, găina de carne, considerată drept animalul de crescătorie cel mai avantajos, produce la capătul a două luni aproape două kilograme de carne consumînd 8,4 kg de proteine vegetale; un bou de 500 kilograme produce 400—500 grame de proteine în 24 de ore. În aceeaşi perioadă de timp, o greutate echivalentă de levură (500 kg) produce 80 de tone de proteine (acestea constituind 40—50% din biomasa totală).

Dacă nu putea fi vorba, în cazul producătorilor de proteine POU, să pretindă înlocuirea soiei, se cerea mai degrabă comercializarea unui produs relativ scump, dar competitiv, care ar putea să înlocuiască făina de peşte şi laptele praf, în alimentaţia porcilor, păsărilor de curte şi, în mai mică măsură, a viţeilor. El putea să servească şi la creşterea peştilor şi ca ingredient în alimentele pentru cîini şi pisici. Specialiştii ICI susţineau că proteinele POU ar putea, în 1985, să concureze soia pe plan economic (în 1982, preţul lor de cost era încă mai ridicat decît cel al alimentelor realizate pe bază de soia, dar valoarea lor nutritivă era socotită ca fiind de două ori mai mare).

Proteinele POU prezentau, în raport cu soia şi făina de peşte, avantajul unei compoziţii constante: ICI şi BP susţineau că produsele lor (Pruteen şi Toprina) aveau calităţile de reproductibilitate ale produselor industriale şi nu compoziţia variabilă caracteristică a produselor agricole. În plus aceste substanţe au constituit obiectul unui număr foarte mare de teste nutriţionale şi de toxicologie, pentru a fi satisfăcute normele de securitate ale diferitelor ţări. Testele efectuate au permis să se tragă concluzia că ingerarea acestor proteine nu producea efecte secundare la animale şi aveau calităţi nutritive incontestabile. Astfel levurile cultivate pe mediile la care substraturile carbonate erau metanolul sau *n*-parafinele conţineau aproximativ 61% proteine. care aveau o cantitate de lizină egală cu 4,5% şi un conţinut mediu de aminoacizi sulfuraţi şi puteau deci să completeze un regim alimentar de creştere pe bază de cereale. Experienţele efectuate de Institutul Francez al Petrolului, împreună cu Institutul Naţional al Cercetării Agronomice, pe şobolani şi pui de găină, au arătat că levura *Torulosis candida* este o sursă de lizină la fel de bună ca făina de peşte sau turta de soia.

Introducerea în celulele de *Chlamydomonas reinhardii* a genelor de *Saccharomyces cerevisiae* şi expresia lor în această cloroficee unicelulară deschid perspective pentru producerea de proteine pe bază de alge şi de alte substanţe celulare interesante pentru alimentaţia umană şi animală (Rochaix şi Van Dillerviger, 1982).

Aceste proteine de origine microbiană trebuiau făcute acceptabile pentru consumul uman. Problemele ridicate erau complexe şi se estima că marile întreprinderi erau sortite eşecului. Dacă a fost ales animalul ca intermediar este pentru că părea foarte dificil, chiar imposibil, să fie schimbate obiceiurile şi comportamentele alimentare ale oamenilor. Totuşi, ideea nu trebuie abandonată. Într-o bună zi am putea vedea că aceste proteine îşi aduc contribuţia, fie şi modestă, la alimentaţia oamenilor.

În 1985, 10—15 uzine avînd fiecare o capacitate de producţie de ordinul a 100 000 de tone pe an urmau să funcţioneze pe plan mondial şi jumătate din ele erau în Europa. Pentru aceeaşi perioadă erau proiectate şi planurile unei a doua generaţii de uzine mai mari. Companiile ar putea să aplice, aşadar, pe o scară superioară, tehnicile şi cunoştinţele dobîndite şi să cunoască mai bine reacţiile consumatorilor la comercializarea unui produs devenit din ce în ce mai abundent.

Proteinele de origine microbiană care nu pot, evident, să rezolve problema foamei în lume, vor juca un rol important în cursul deceniului viitor, în domeniul alimentaţiei animalelor şi, mai tîrziu, în cel al hranei oamenilor, deoarece istoria acestor proteine abia a început. Va trebui, fără îndoială, să fie revăzută fabricarea lor şi orientarea către pieţe capabile să plătească un produs

scump destinat producerii de carne, a cărei sporire însoțește creșterea nivelului de trai. Dacă lucrurile stau așa în țările în curs de dezvoltare, producerea de proteine POU nu ar prezenta interes decît pentru clasele bogate sau pentru export, ceea ce nu ar reduce deficitul alimentar, ci ar agrava și mai mult deosebirile sociale pe plan nutrițional. De aceea, instalațiile la scară mică, puțin costisitoare, reciclînd, la nivelul unui sat, deșeurile agricole pentru o mai bună alimentație a oamenilor și a vitelor, prezintă mult mai multe avantaje decît marile uzine. Construirea acestora ar fi totuși justificată în unele țări producătoare de petrol și, în același timp, mari importatoare de produse alimentare.

Conversia deșeurilor și subproduselor agricole și industriale cu ajutorul microorganismelor

Subprodusele precum și deșeurile din activitățile agricole și forestiere și din industriile agroalimentare pot fi utilizate în scopuri foarte diverse, în special energetice, avînd drept consecință valorificarea biomasei și scăderea poluării mediului înconjurător. Ele pot fi, de asemenea, degradate în compuși fermentabili de către microorganisme sau transformate în proteine, în același mod ca alcanii sau *n*-parafinele (subproduse ale rafinării petrolului), metanul sau metanolul. Cultura algelor în ape uzate, care a cunoscut progrese și perfecționări importante, contribuie la epurarea acestor ape și furnizează o biomasă bogată în proteine și oligoelemente. Factorii de rentabilitate economică, dar și adaptarea la contextul economico-social, condiționează natura și mărimea proceselor de transformare (Imrie, 1975; Tudge, 1975; DaSilva ș.a., 1978; Lee Boon Yang ș.a. 1980).

Natura și cantitățile de subproduse și deșeuri

Cantitățile de subproduse și de deșeuri apte de a fi transformate și valorificate sînt foarte importante. În tabelul 10 sînt redate cantitățile disponibile de subproduse agricole, în 1976, în cîteva țări europene, în timp ce, în cazul Franței, în 1979 au fost produse 395 de milioane de tone de deșeuri organice (inclusiv cele de origine agricolă). În Japonia, erau produse anual 76 600 000 de tone de paie de orez, de pleavă de orez, de deșeuri de lemn și de alte reziduuri agroalimentare (1979).

În 1978, Programul Națiunilor Unite pentru mediul înconjurător (PNUE) semnala următoarele: diversele cereale cultivate în lume furnizau aproape 1,7 milioane de tone de paie pe an, din care majoritatea rămîneau neutilizate; exploatarea trestiei de zahăr și industria zahărului produceau, anual, 50 miliarde de tone de deșeuri de trestie de zahăr și 67 milioane de tone de resturi lemnoase, cît și melase și reziduuri din fabricile de zahăr. Deși, în Indonezia, apele reziduale ale melasei sînt utilizate pentru fertilizarea orezăriilor, deși reziduurile din fabricile de zahăr servesc drept amendament al solului sau sînt incorporate în alimentele vitelor, iar resturile lemnoase pot

Tabelul 10. **Tonajele subproduselor agricole din cîteva țări europene (1976)**

Țara	Paie de cereale	Subproduse din culturi	
		Porumb	Sfeclă
Belgia	1 765 000 (3,6—4,4 t/ha)	—	120 000
Italia	8 850 000 (1,5—2,5 t/ha)	4 000 000	—
Olanda	1 350 000 (3,5 t/ha)	—	110 000
R.F.G.	8 600 000	—	700 000—2 000 000
Marea Britanie	6 000 000 (3—3,5 t/ha)	—	375 000—1 200 000

fi folosite drept combustibil în instalațiile de măcinare, toate aceste deșeuri sînt încă în mare măsură subutilizate.

Ananasul este un exemplu tipic al numeroaselor fructe din care se pierde o bună parte: în cazul conservării, se folosește mai puțin de 20% din fructul întreg (în Malaezia, în 1974, din 250 000 de tone de ananas, nu se produceau decît 40 000 de tone de fructe conservate, și 210 000 de tone de reziduuri). Pulpa, coaja și deșeurile proaspete de ananas sînt adesea strivite pentru a se mai extrage suc și reziduurile uscate servesc drept alimente pentru vite; fermentația alcoolică permite, în plus reducerea unei serioase poluări a apelor cauzate de lichidele și deșeurile dulci din fabricile de conserve de ananas.

Subprodusele agricole și cele ale industriilor agroalimentare pot fi împrăștiate (paie) sau adunate aproape de unitatea de producție (rumeguș, zer); primele sînt disponibile la un preț superior. Utilizarea unui subprodus sau transformarea lui de către microorganisme este funcție de diferența existentă între costul acestei utilizări și cel al folosirii altor substraturi; ea trebuie să ia în considerație și consecințele asupra mediului înconjurător (costul poluării eventual produse sau, dimpotrivă, avantajele unei reduceri a poluării).

Procedeele biotehnologice, în special cele privind conversia materiilor organice cele mai diverse datorită fermentațiilor și metabolismului microorganismelor, se află, de asemenea, la originea unei poluări chimice și biologice a mediului. Astfel, o singură fabrică de bere poate produce aproape 10 000 de metri cubi de efluenți pe zi, a căror nevoie biologică de oxigen echivalează cu cea a apelor uzate ale unui oraș cu 200 000 de locuitori. La începutul anilor '70,o anchetă întreprinsă în S.U.A. a arătat că fermentațiile reprezentau principala sursă de poluare în industria farmaceutică. Într-adevăr, în cazul antibioticelor, de exemplu fermentația este mijlocul de producție pe scară largă, exceptînd cloramfenicolul; capacitatea fermentatoarelor folosite poate atinge 400 000 de litri și deșeurile conțin celule microbiene, anumiți produși metabolici precum și ingredientele neconsumate din mediul de cultură. Lichidele reziduale provenind din producerea streptomicinei au o cerință biologică de oxigen de ordinul a 32 000 de părți per milion și antrenează o puternică poluare a apelor în care sînt aruncate.

Degradarea și conversia cu ajutorul microorganismelor

Subprodusele și deșeurile conținînd glucide pot fi transformate prin fermentații microbiene tradiționale sau prin procedee biotehnologice ținînd de microbiologia industrială.

Astfel, melasele, care sînt sursa de cristalizare a zaharozei și care sînt retrase din circuitul de fabricație cînd concentrația în zahăr devine prea slabă, constituie subproduse bogate, conținînd în afară de zahăr, sulfit, carbonați și săruri de potasiu și magneziu (mai ales melasele de sfeclă), utilizate în procedeele de extracție a zaharozei. Fermentația melaselor nu convertește totuși, tot zahărul rezidual.

Amidonul constituie peste 50% din materia uscată a boabelor de cereale, a cartofului și manioculuí. Este deci un produs abundent, extras mai ales din porumb, dar și din grîu nepanificabil și din cartof; hidroliza lui acidă sau enzimatică este ușoară și dă dextrine și glucoză. Această hexoză este, de altfel, produsă în acest mod în industrie, în scopul producerii etanolului prin fermentare și a siropurilor de fructoză (v. pag. 218).

Hemicelulozele conțin un ansamblu de poliozide asociate cu celuloza în peretele primar și secundar al celulelor vegetale. Ele reprezintă 10% din masa lemnului rășinoaselor și 20% din cea a lemnului de foioase. Această proporție depășește 30% în paie și știuleții de porumb. Hidroliza hemicelulozelor, mai ales a xilanurilor, produce pentoze și anume xiloză. Cercetători elvețieni aparținînd grupului industrial Sulzer au reușit să extragă leșii bisulfitice din uzinele de pastă de hîrtie din xiloză: 24 de kilograme de xiloză dintr-o tonă de deșeuri. În cazul resturilor lemnoase, randamentul era mai bun, de ordinul a 120 de kilograme de xiloză per tonă.

Cercetătorii de la Solar Energy Research Institute (SERI) au descoperit în 1982 o bacterie anaerobă, *Thermobacteroides saccharolyticum*, care era în stare să degradeze hemicelulozele conținute în furajele sau deșeurile de lemn, la o temperatură de peste 40°C. Produsele finite obținute erau, între altele, etanolul și acidul lactic. Cercetătorii de la SERI au încercat să izoleze enzimele care descompun hemicelulozele și care fermentează produsele acestei degradări.

Separat, Schneider (National Research Council din Canada) și Tsao (Purdue University) au arătat că xiloza, o dată transformată în xiluloză, putea fi fermentată în etanol de *Saccharomyces cerevisiae*. Izomerizarea xilozei în xiluloză este catalizată de xiloz-izomeraza a cărei genă ar putea fi introdusă în celulele de levuri, pentru a realiza izomerizarea aldopentozei în aldocetoză, apoi fermentarea ei în etanol. Pe de altă parte, xilitolul ar putea fi produs din xiloză; el are o putere de îndulcire ridicată și nu favorizează formarea cariilor dentare.

Cît privește hidroliza celulozei în glucoză, ea poate fi efectuată de *Trichoderma reesii*, a cărei celuloză degradează celuloza cristalină și insolubilă. Spano și colaboratorii săi, din Laboratoarele intendenței Armatei Americane, de la Natick, în statul Massachusetts, au izolat mutanți de *T. reesii* capabili să producă de 2—4 ori mai multă celuloză decît sușa sălbatică. Procedeul de hidroliză a celulozei este extrem de simplu: ciuperca este cultivată într-un mediu ce conține pastă de molid și săruri minerale; mediul de cultură este

filtrat, elementele solide eliminate și rămîne un lichid de culoare a chihlimbarului care conține enzima. Această soluție împreună cu hîrtie măcinată se introduc într-un recipient, la temperatura de 50°C și la presiunea atmosferică; reacția de hidroliză produce un sirop glucozat, apoi celuloza nehidrolizată și enzima sînt reciclate. Randamentul de glucoză corespunde hidrolizei a 50% din celuloza prezentă inițial. La Natick, o uzină-pilot trata pînă la 500 de kilograme de celuloză pe lună și capacitatea sa putea atinge 2 000 de kilograme. Prin acest procedeu, o tonă de cartoane vechi sau de paie dădea 150 de litri de etanol, obținut prin fermentarea glucozei produse prin hidroliza celulozei.

Transformarea deșeurilor celulozice în etanol era considerată în S.U.A. ca mult mai interesantă și promițătoare decît producerea de alcool din amidon de porumb. Trei tipuri de procedee erau studiate de cercetătorii americani. După cercetările efectuate în Laboratoarele Intendenței Armatei, de la Natick, cercetătorii din aceste laboratoare și cei de la Universitatea statului California, din Berkeley, utilizau celulazele și hemicelulazele de *Trichoderma reesii* pentru a degrada biomasa în zaharuri; hexozele erau fermentate în etanol de către levuri, în timp ce pentozele sufereau un alt tip de fermentație; enzimele și celuloza nedegradată erau reciclate, iar lignina reziduală era folosită ca sursă de energie pentru distilarea alcoolului. Tehnologia dezvoltată la Universitatea din Arkansas și aplicată pe plan industrial de compania petrolieră Gulf Oil consta în realizarea simultană a zaharificării celulozei și fermentarea ozelor obținute prin această hidroliză prin adăugarea la amestecul de biomasă celulozică-levuri, mijlocul de producere a celulozelor. Reziduurile de lignină serveau, de asemenea, drept combustibili pentru distilare, dar pentozele nu erau fermentate. O uzină urma să fie construită în Virginia de firma Bio Fuel Industries, din Richmond, pentru a produce, în 1985, urmînd acest procedeu și cu celulaza de *Trichoderma reesii*, 500 de tone de etanol pe zi pornind de la 2 500 de tone de deșeuri celulozice. A treia tehnologie consta dintr-o fermentare directă de către bacteriile celulolitice a hexozelor și pentozelor provenind din hidroliza celulozei și a hemicelulozelor. Avantajele acestei tehnologii, dezvoltate în laboratoarele din Massachusetts Institute of Technology, erau, în afară de conversia simultană a pentozelor și hexozelor în etanol, combinarea celulolizei și fermentației alcoolice, precum și reducerea pretratării substraturilor la strictul necesar.

Degradarea și transformarea de către microbi a substanțelor celulozice și hemicelulozice permit, așadar, obținerea etanolului și a materiilor prime pentru industria chimică (furfurol, fenoli, cresoli). Din 200 000 de tone de paie transformate în mod eficient ar putea fi produse 50 000 de tone de etanol și 20 000 de tone de furfurol. După unii specialiști, 30% din compușii de origine petrochimică ar putea fi produși pornind de la transformările microbiene ale celulozei. Tehnicile de recombinare genetică vor contribui la izolarea sușelor cel mai bine adaptate la aceste transformări și celor mai performante, pentru a dezvolta o veritabilă strategie de substituție, care ar deveni operațională după anul 2000 (carbochimia ar prelua atunci ștafeta petrochimiei în fabricarea noilor biopolimeri, biosolvenților și biodetergenților).

De exemplu, transferul genelor celulazei și hemicelulazei de *Clostridium thermocellum* la alte specii de *Clostridium*, ar permite transformarea celulozei și hemicelulozelor în etanol, acetonă, butanol, în acid acetic și în acid

lactic. Termofilia anumitor suşe de *Clostridium* (temperatura de creştere optimă cuprinsă între 65 şi 75°C) ar prezenta avantajul că s-ar micşora preţul distilării etanolului şi al altor solvenţi şi procesele de producţie ar fi mai economice. Cercetătorii Universităţii din South New Wales—Australia, şi cei ai Universităţii Rutgers — S.U.A., au descoperit că bacteria *Zymomonas mobilis*, izolată din vinuri de palmier sau pulque, care este o băutură mexicană, fermenta zahărul de două ori mai rapid decît levurile. Această specie se pretează la modificări ale genomului, fapt care îi permite să degradeze celuloza şi să realizeze simultan fermentarea zaharurilor care provin din această degradare.

Utilizarea microorganismelor în lupta împotriva poluării

Epurarea apelor uzate, eliminarea unei proporţii însemnate a materiilor organice conţinute în lichidele reziduale, se realizează de către microorganisme aerobe şi anaerobe. Rezultate spectaculoase au fost obţinute, de exemplu, prin tratarea efluenţilor din fabrici de bere, fabrici de ulei, de cidru, de lapte, de brînză, şi de amidon printr-un procedeu anaerob care reciclează nămolul biologic activ, produce mai puţine nămoluri reziduale, împiedică în mare măsură degajarea mirosurilor neplăcute şi produce puţin metan utilizat în alimentarea cazanelor din instalaţiile de tratare (v. pag. 198).

Suşele microbiene ar putea fi izolate pentru a lupta împotriva diverselor forme de poluare chimică, de exemplu pentru a descompune biocizii greu biodegradabili, detergenţii, materialele plastice sau hidrocarburile.

Astfel, bacterii aparţinînd genului *Pseudomonas* posedă enzime de oxido-reducere sau de hidroxilare care pot degrada un mare număr de molecule de hidrocarburi sau de compuşi aromatici adesea foarte toxici (benzen, toluen, xilen). Este cazul mai multor suşe de *Pseudomonas putida*, ale cărei plasmide poartă gene care determină sinteza unor asemenea enzime. Patru din aceste plasmide sînt: OCT (degradarea octanului, hexanului şi decanului), XYL (degradarea xilenului şi toluenului), CAM (descompunerea camforului) şi NAH (degradarea naftalinei). Plasmidele CAM şi NAH sînt autotransferate în procesul conjugării între celule bacteriene, în timp ce celelalte plasmide nu pot fi transferate decît în cazul în care plasmidele conjugative sînt introduse în bacterii. Chakrabarty (pe atunci la General Electric Company) a obţinut, în 1979, după mai multe încrucişări, o suşă care conţinea plasmidele XYL şi NAH precum şi o plasmidă hibridă provenind din recombinarea plasmidelor CAM şi OCT (acestea din urmă erau într-adevăr „incompatibile" şi nu puteau coexista independent în aceeaşi celulă bacteriană). Această suşă era capabilă să se dezvolte rapid pe petrol brut, deoarece metaboliza hidrocarburile mult mai activ decît oricare dintre suşele posedînd un singur tip de

plasmidă [1]. Ea putea fi extrem de utilă în eleşteele de epurare a apelor uzate, în care puteau fi controlate temperatura şi alţi factori mezologici.

În ceea ce priveşte degradarea hidrocarburilor de către bacterii, cercetările se referă în special la accelerarea acestui proces care este în general foarte lent. Cercetători americani au reuşit să izoleze din staţii de epurare a apelor surse bacteriene care puteau să degradeze hidrocarburi şi care au fost utilizate în golful Mexicului. Cercetătorii laboratorului „mediu înconjurător" al Societăţii Naţionale Elf-Aquitaine (SNEA), din Pau (Franţa), au pus la punct un procedeu care consta în favorizarea proliferării speciilor bacteriene existînd în mediul marin şi care degradează hidrocarburile; accelerarea acestei biodegradări era obţinută prin deversarea în zonele poluate a unei microemulsii conţinînd carbon incapsulat şi protejat într-o soluţie ce conţinea pe deasupra azot şi fosfor. Aportul acestor substanţe stimula în mod eficace înmulţirea bacteriilor. Experienţele făcute de cercetătorii francezi în Atlantic, Mediterana şi lîngă insulele Kerguelen au făcut posibilă constatarea că într-o săptămînă 70—90% din hidrocarburi au dispărut din zonele poluate cărora le fusese aplicat procedeul elaborat de ei, faţă de 12—20% în zonele netratate. După fiecare operaţie, densitatea fitoplanctonului era mai mare. Produsul acţiona în proporţie de cel puţin 1/10, proporţie care era caracteristică pentru majoritatea agenţilor dispersivi utilizaţi în lupta împotriva poluării datorate hidrocarburilor. Avantajul procedeului biologic era că el nu mai introducea alt agent poluant în mediu. El putea fi folosit atît în largul mării cît şi în zonele de mlaştini şi lagune unde nu este uşor de intervenit, sau în cazul micilor poluări accidentale, în mediu portuar de exemplu.

Produsul urma să fie comercializat încă de la începutul anului 1983, în timp de cercetările laboratorului din Pau al SNEA se orientau către elaborarea unui procedeu apt să provoace proliferarea unui număr mai mare de grupe de bacterii marine capabile să degradeze hidrocarburile.

Anumiţi microbi pot modifica o moleculă, care apoi va fi degradată de alţi microbi. Acest fenomen de „cometabolism" intervine, de exemplu, în descompunerea unui puternic insecticid foarte poluant, parationul, după cum au arătat Daughton şi Hsieh (Universitatea din California) cu două suşe de *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* şi *P. stutzeri* (Lecocq, 1982).

Detoxificarea este adesea nu atît degradarea completă a moleculei toxice cît consecinţa unei transformări chimice a acesteia: fosforilare, metilare, acetilare etc. Enzimele care catalizează aceste reacţii de detoxificare sînt adesea sub controlul genelor purtate de plasmide. Kellogg, Chatterjee şi Chakrabarty (1981, Lecocq, 1982), de la Universitatea Statului Illinois din Chicago, au reuşit să obţină o cultură microbiană capabilă să metabolizeze complet 2, 4, 5,-T (acid 2, 4, 5- triclorofenoxiacetic), care este un puternic erbicid foarte larg utilizat. Aceşti cercetători au izolat, din staţii de epurare, mai multe microorganisme pe care le-au amestecat, după aceea, cu alte suşe bacteriene conţinînd plasmide purtătoare ale genelor enzimelor de degra-

[1]) Chakrabarty şi colaboratorii lui de la Universitatea statului Illinois au încercat să izoleze suşe de bacterii capabile să reducă viscozitatea varietăţilor de petrol grele, prin degradarea cerurilor şi parafinelor componente. Aceste cercetări făcute în cadrul unui contract semnat în 1982 între Universitatea din Illinois şi societatea Petrogen, aveau ca obiective secundare eliminarea sulfului din petrol şi recuperarea petrolului brut din şisturile şi nisipurile bituminoase.

dare a unor compuși aromatici (toluen, xilen) dintr-un derivat clorat (4-clorocatechol) și salicilați. Ei au cultivat apoi aceste microorganisme într-un chemostat unde ele nu puteau crește decît pe seama acidului 2,4,5-T. După 10 luni de cultură, viteza de creștere a bacteriilor a sporit considerabil, deoarece 2,4,5-T era consumat în cîteva zile, chiar în concentrație foarte ridicată, de 1,5 mg/ml. Acești cercetători au încercat să izoleze o sușă unică care conținea o plasmidă purtătoare a genelor tuturor enzimelor ce catalizau diferitele etape ale descompunerii acidului 2,4,5-T.

Tehnicile de recombinare genetică fac posibilă obținerea unui asemenea rezultat și ar putea fi așadar proiectată crearea de sușe microbiene capabile să descompună și să asimileze numeroșii compuși, cel mai adesea nebiodegradabili (sau xenobiotici), produși mai ales în industria chimică.

Producerea de energie cu ajutorul microorganismelor pornind de la biomasă. Bioenergia

Biomasa şi energia

Pătura vegetală a Terrei măsoară peste 1 800 miliarde de tone de materie uscată, echivalentul energetic a $30 \cdot 10^{21}$ J, corespunzînd rezervelor de energie „fosilă". Pădurile constituie aproape 68% din biomasa terestră, ecosistemele ierboase în jur de 16% şi terenurile cultivate numai 8%. Pe întreaga planetă, cele 173 de miliarde de tone de substanţă uscată produse în fiecare an prin fotosinteză reprezentau, în 1979, de peste 20 de ori energia „fosilă" consumată în lume, sau de 200 de ori energia inclusă în alimentaţia celor patru miliarde de locuitori ai planetei (Chartier, 1980: Chartier şi Mériaux, 1980).

Acest potenţial energetic considerabil al biomasei era exploatat de vreme ce în 1979 a şaptea parte din energia consumată în lume provenea din biomasă, adică echivalentul a trei milioane de tone de petrol pe zi. Formele de energie necomercializate (lemn, cărbune de lemn, gunoi de grajd uscat etc.) reprezentau peste 85% din consumul de energie în mediu rural din întreaga lume.

Cînd este vorba de substanţe uscate, calea cea mai simplă de transformare a biomasei în energie este arderea, care furnizează căldură, transformată la rîndul ei în forţă motrice sau în electricitate. În schimb, conversia în biogaz (metan) reprezintă filiera de transformare cea mai veche şi cea mai eficace a materialelor umede.

Se mai poate obţine energie şi din culturi destinate exclusiv sau aproape exclusiv acestui scop. Este cazul plantaţiilor de arbori cu creştere rapidă, cazul plantelor alcooligene, bogate în glucide uşor hidrolizabile (amidon şi zaharoză) în hexoze, care sînt supuse fermentaţiei alcoolice. Producerea de alcool etilic din această biomasă vegetală cuprinde, aşadar, extragerea şi hidroliza glucidelor de rezervă, apoi fermentarea lor în alcool de către microorganisme (Demeyer ş.a., 1981). Acestea din urmă au deci un rol esenţial în producerea acestei forme de energie. Ele puteau fi folosite şi în mod direct în unele reacţii de conversie energetică sau puteau fi apte, în cazul algei *Botryococcus braunii*, pentru cultura masivă în scopul producerii de hidrocarburi.

Producerea de etanol

Modalităţi şi condiţii de producere

Sinteza chimică a etanolului se face pornind de la etilenă (provenind din petrol sau gaz natural), care este convertită la temperatură înaltă în prezenţa apei şi a catalizatorilor. La începutul secolului XX, etanolul era produs pe scară largă prin fermentare, în timp ce, în cursul utltimilor ani, 70% din etanolul prcdus, de exemplu în S.U.A., era rezultatul sintezei chimice, deoarece preţurile zahărului şi amidonului erau mult prea ridicate: dar creşterea preţurilor petroliere redă şansele în favoarea fermentaţiei alcoolice.

Printre plantele alcooligene intrate în exploatare, sau care pot fi cultivate în scopul producerii de etanol, se numără maniocul, cerealele (mai ales porumbul), cartoful şi napul, ale căror glucide de rezervă sînt amidonul şi inulina (numai în cazul napilor) precum şi trestia de zahăr, ananasul, sfecla de zahăr şi sorgul zaharat, la care zaharoza este hidratul de carbon principal.

Ameliorarea producţiei prin fermentaţie se obţine datorită progreselor biotehnologice realizate (folosirea enzimelor şi a celulelor fixate) sau scontate (recombinări genetice pentru izolarea celor mai performante levuri). Sporirea acestei producţii se justifică într-adevăr prin folosirea etanolului în industria chimică şi drept carburant (substituent sau aditiv al benzinei).

Etanolul este într-adevăr un solvent, un agent de extracţie şi un antigel; el serveşte, de asemenea, la sinteza a numeroşi alţi solvenţi, tincturi, substanţe farmaceutice, lubrifianţi, adezivi, detergenţi, pesticide, plastifianţi, explozivi şi răşini pentru fabricarea fibrelor sintetice.

Utilizarea etanolului drept carburant în motoarele cu combustie internă se poate face fie sub formă de etanol anhidru (99,8%), amestecat cu benzină în proporţie maximă de 20%, fie sub formă de etanol hidratat (94%) neamestecat cu benzina. În primul caz, etanolul modifică substanţial indicele octanit şi alte caracteristici de funcţionare ale motoarelor, ca demarajul, carburaţia şi emisiile de gaz. Valoarea economică a alcoolului amestecat cu benzina este cu 15—20% mai ridicată decît cea a alcoolului utilizat ca substituit al benzinei.

În uzinele care prelucrează trestia de zahăr, care sînt cele mai simple, trestia este spălată, măcinată, şi celuloza este separată de sucurile dulci. Resturile lemnoase sînt uscate, apoi arse pentru a furniza energia necesară. Sucurile dulci sînt concentrate, sterilizate şi apoi fermentate. Etanolul este separat de elementele solide ale fermentaţiei şi din soluţia alcoolică de 8—10% prin distilare. Lichidele reziduale sînt foarte poluante şi, tratate în mod convenabil, pot da 2—3% elemente fertilizante. În uzinele prelucrătoare de plante bogate în amidon, este nevoie de o etapă suplimentară, pe lîngă cea legată de hidroliza amidonului în zaharuri fermentabile; în plus, în absenţa resturilor lemnoase, este nevoie de o sursă de energie exterioară.

Eforturile de ameliorare a producţiei de etanol au avut ca obiect: dezvoltarea unei tehnologii de fermentare continuă pentru a obţine o concentraţie în alcool mai ridicată (12% în loc de 8—10%); sporirea randamentului energetic printr-o distilare mai eficace şi o mai bună recuperare a căldurii;

folosirea reziduurilor şi a subproduselor agricole drept combustibil sau materii prime; utilizarea altor plante alcooligene, ca sorgul zaharat sau maniocul.

În ţările în curs de dezvoltare, producţia de etanol din trestie de zahăr era probabil economică pentru preţurile petrolului brut în vigoare în 1980, circa 31 de dolari barilul franco la ţărmul Golfului Persic (echivalent cu preţul benzinei la rafinărie de 0,27 dolari litrul), sub rezerva, totuşi, că preţul trestiei de zahăr transportată la uzină era sub 14 dolari tona (Banca mondială, 1981). Producerea de etanol din melase, prin utilizarea resturilor lemnoase drept combustibil, era, după toate aparenţele, economică în raport cu preţurile actuale ale petrolului brut, cu condiţia ca valoarea melasei adusă la uzină să fie sub 60 de dolari tona. Dacă distilarea alcoolului s-ar face prin arderea combustibilului şi nu a resturilor lemnoase de trestie, producţia de etanol ar fi mai puţin interesantă pe plan economic. În cazul uzinelor care utilizează materiile prime amidonoase, producţia de alcool este rentabilă dacă tona de manioc revine la cel puţin 13 dolari şi oborocul mic de porumb (35,23 litri) la sub un dolar.

Eficienţa economică a producţiei de alcool etilic este funcţie de: sistemele de cultură (ţările producătoare de trestie de zahăr şi melase pe scară largă sau care dispun de excedente agricole sînt mai în măsură să desfăşoare programe de producere a etanolului); costul materiilor prime extrase din biomasă şi de sursa de combustibil; preţurile de cost ale uzinelor; preţurile de distribuire (în ţările fără ieşire la mare sau în regiunile îndepărtate cu infrastructură limitată, marea valoare economică a unui produs de substituire a benzinei poate justifica producerea de etanol, chiar dacă preţurile materiei prime şi/sau costurile de instalare a uzinelor sînt ridicate).

Concurenţa între producţia de alcool şi producţia de mărfuri alimentare în ceea ce priveşte utilizarea terenurilor cultivabile trebuie să fie examinată în funcţie de evoluţia preţurilor energiei şi a celor ale produselor agricole. Se admite în general că primele vor creşte mai mult decît celelalte în cursul deceniului 1980—1990 şi presiunea economică riscă atunci să se exercite în favoarea folosirii unei proporţii mai mari a produselor agricole pentru producerea de energie. Definirea priorităţilor în acest domeniu nu va fi uşor de realizat şi este necesar ca în orice caz să se coordoneze strîns producţia de alcool cu funcţionarea sistemelor agricole şi cu cel al sectoarelor consumatoare de energie. Este totuşi posibil să fie dezvoltată cultura anumitor specii de plante energetice pe terenuri mai puţin fertile, cum ar fi maniocul în zonele semiaride.

Programele naţionale de producere de alcooli-carburanţi

În 1975, guvernul brazilian a hotărît să producă alcool pe scară largă din trestie de zahăr sau manioc, pentru a înlocui benzina. O atare decizie venea ca urmare a creşterii preţului petrolului şi, în mai mică măsură, scăderii cursului zahărului pe piaţa mondială. Preţul de achiziţie al petrolului depăşea 997 de milioane de dolari în 1970 şi 10 miliarde în 1979/1980. În 1981, importul de petrol urma să reprezinte peste jumătate din importul total, datoria externă a acestei ţări depăşind atunci 50 miliarde de dolari (la începutul anului 1983 ea era evaluată la 84 de miliarde de dolari). Pe

de altă parte, Brazilia, care era a doua mare producătoare de zahăr din lume, avea dificultăți la desfacerea produselor sale pe o piață devenită excedentară datorită scăderii consumului în țările industrializate și creșterii cantităților de zahăr produse din sfeclă de zahăr.

Pînă în 1978, programul producției de alcool prezenta unele dificultăți în desfășurarea sa, deoarece randamentul mediu al trestiei de zahăr (50 de tone la hectar) nu era foarte favorabil unei sporiri a producției (un randament de 150 de tone la hectar este un randament obișnuit în plantațiile moderne, ceea ce corespunde unei cantități de 50—100 hectolitri de alcool pe hectar). În 1980, creșterile succesive ale prețului petrolului au determinat guvernul să dea prioritate acestui program și să-i acorde tot atîtea credite cît pentru instalarea centralelor nucleare. Intenția declarată a guvernului era de a înlocui, în 1985, o treime din importul de petrol cu alcool și de a face să funcționeze trei milioane de automobile (o treime din parcul de automobile) cu etanol. Obiectivul inițial, care era de a adăuga alcool benzinei consumate în Brazilia în proporție de 20%, urma să fie realizat începînd din 1981 (Cosse-Manière, 1981).

De la crearea programului Pro-Alcool, în 1975, Brazilia a produs 65 400 000 hectolitri de alcool, adică 61% din producția totală cumulată proiectată pentru 1985. Recolta 1979/80 a produs 37 000 000 de hectolitri, cea din 1980/81 urma să atingă 40 000 000 și cea din 1985, 170 000 000 de hectolitri.

Pentru a răspunde în parte criticilor aduse programului și pentru a-l orienta mai bine, experții brazilieni s-au interesat în special de două aspecte esențiale: pe de o parte, aprovizionarea micilor comunități cu uzine capabile să producă 1 000—40 000 de litri de alcool pe zi; pe de altă parte, studierea materiilor prime fermentabile altele decît zahărul din trestie. Maniocul părea să răspundă foarte bine acestei forme de transformare: o tonă de manioc producea 80 de litri de alcool, în timp ce aceeași cantitate de trestie de zahăr dădea numai 60 de litri. Alegerea manioculuí prezenta marele avantaj de a nu abate cultura trestiei de zahăr de la obiectivul său inițial: producerea zahărului. În plus, antrepozitarea manioculuí se făcea mai ușor, ceea ce garanta activitatea în uzine în tot cursul anului, altfel decît la trestia de zahăr, a cărei producție era sezonieră. Cultura manioculuí oferea pe deasupra posibilitatea creării mai multor locuri de muncă decît cea a trestiei de zahăr, care este mecanizată pe larg. Comisia executivă națională a alcoolului a inventariat, în 1980, 309 proiecte, dintre care 297 se refereau la trestia de zahăr și 12 la manioc; un alt proiect se baza pe exploatarea unei specii de palmier (babacu).

Mai multe țări latino-americane (Costa Rica, Venezuela, printre altele), africane (Volta Superioară, Mali, Niger, Ciad) și asiatice (Filipine) s-au arătat foarte interesate de experiența braziliană, în special de faptul că producția și recoltarea trestiei de zahăr, fabricarea alcoolului, distribuția și consumul acestuia din urmă aveau toate loc pe teritoriul național.

În S.U.A., producția de etanol a atins 619 000 tone în 1980 (fără a mai socoti băuturile alcoolizate), adică o cifră de vînzări echivalentă a 297 milioane de dolari (în Scientific American, 1981). Amestecul de 6—9 părți benzină la o parte etanol („gasohol") au fost comercializate în 1980 și erau de vînzare în 800 de benzinării răspîndite în 28 de state. Vînzările anuale erau de 650 000 tone și au atins 1 200 000 tone în 1981. Consumul amestecului de benzină și alcool era favorizat de administrația americană, care a acordat

o dispensă parțială de taxe asupra carburanților conținînd cel puțin 10% etanol. Înlocuirea în întregime a benzinei consumate în această țară cu „gasohol" ar necesita o producție de cel puțin 45,6 miliarde de litri de etanol pe an, în timp ce aceasta era, în 1980, de circa 1,14 miliarde de litri. Cerealele excedentare ar putea servi în acest scop, dar nu s-ar obține mai mult de 7,6 miliarde de litri de etanol pe an. Utilizarea cerealelor pentru producerea de etanol a făcut posibilă construirea de uzine în Middle West, dintre care unele erau foarte mari, cum ar fi cea din Archers Daniels Midland, instalată la Des Moines, în Iowa, care avea o capacitate de producție anuală de 0,8 milioane de tone de alcool. În 1985, producția totală a S.U.A era evaluată la 5—6 milioane de tone și limita de staturație a pieței (30 de milioane de tone) urma să fie atinsă către 1990 (în Scientific American, 1981).

În Franța, se încerca să se producă alcool din sfeclă de zahăr, napi sau trestie de zahăr, în Bouches-du-Rhône (dar etanolul revenea, în 1980, de 3—5 ori mai scump decît benzina).

În insula Réunion, cultura de trestie de zahăr, care din 1815 s-a dezvoltat și a devenit cultură industrială, ocupă 37 000—40 000 de mii de hectare, circa 70% din suprafața agricolă utilă a acestui teritoriu francez de peste mări. Producția de zahăr era de 247 000 tone pe an în medie între 1976 și 1981, randamentul crescînd de la 54 la 65 de tone de trestie la hectar. Un plan de modernizare a industriei zahărului, început în septembrie 1974, prevedea o producție anuală de 300 000 de tone de zahăr asigurată de cinci fabrici cu o capacitate de 55 000—60 000 tone fiecare. Aceste fabrici de zahăr trebuiau echipate cu centrale electrice folosind deșeurile lemnoase ale trestiei ca sursă de energie. Producția anuală de resturi lemnoase era de 700 000 tone și o mare parte urma să fie distrusă, deși o tonă de resturi lemnoase are puterea energetică a unui baril de petrol. Tehnologia pusă la punct pentru aceste centrale electrice făcea posibilă producerea unui kilowatt-oră din două în loc de șase kilograme de resturi lemnoase. Interesul prezentat de aceste centrale consta nu numai în a utiliza un deșeu produs în cantități însemnate, dar și de a suplini hidrocentralele pe perioada anotimpului uscat, a cărei durată corespunde cu cea a campaniei trestiei de zahăr (august-decembrie). În insula Réunion se proiecta producerea de alcool-carburant: în 1983 urma să intre în lucru o distilerie, dar rentabilitatea economică a proiectului nu părea să fie asigurată, în măsura în care prețul litrului de etanol produs urma să fie de ordinul a 3,50 franci în afara taxelor.

Napul părea să aibă superioritate asupra altor plante alcooligene, din cauza ameliorării genetice al cărei obiect a fost și a producerii însemnate de deșeuri care să acopere nevoile calorifice ale distilării. Randamentul de tuberculi era de 50—60 de tone pe hectar, fără aport de îngrășăminte și cu varietăți neameliorate genetic. Conținutul în zaharuri al tuberculilor (glucidul de rezervă este inulina, care este un fructozan) face posibilă obținerea, după hidroliză și fermentație, a 30—50 hectolitri de amestec acetonă-butanol pe hectar.

În Franța, unele studii aveau ca obiect adaptarea la recoltarea napilor a unui material care fusese conceput pentru cea a cartofilor, precum și asupra conservării tuberculilor. S-au efectuat studii în colaborare cu Institutul Francez al Petrolului, asupra extracției inulinei, hidrolizei acestui polizaharid și fermentației acetono-butanolice. Pe deasupra, în 1982 au fost realizate o serie de încercări de cultură în 14 loturi de cîte 10 hectare fiecare,

repartizate în diversele regiuni producătoare în mod potențial. O unitate pilot de producție, instalată la Attin, în Pas-de-Calais, urma să producă 10 tone de acetonă-butanol pe zi din 200 tone de tuberculi, începînd din 1983. Investiția era în jur de 65 de milioane de franci (115 milioane dacă se adăuga și costul cercetărilor respective). O uzină mai importantă urma să fie construită în 1984 și guvernul francez să proiecteze pentru 1990 cultivarea napilor pe 500 000 de hectare (o suprafață echivalentă celei dedicate sfeclei), ceea ce urma să reprezinte o producție energetică de 1,5—2 milioane de tone de echivalent petrol, după părerea cadrelor responsabile din Comisariatul în Problema Energiei Solare (COMES) și Ministerul Agriculturii.

Obiectivul Comisariatului Francez în Problema Energiei Solare era de a înlocui, în 1985, 10% din supercarburantul consumat de automobile cu un amestec de metanol și acetonă-butanol. COMES trebuia să investească, în acest scop, în 1982, 45 de milioane de franci, atît pentru realizarea de unități-pilot de producere de biocarburanți cît și pentru susținerea cercetărilor indispensabile. Pe lîngă uzinele producătoare de acetonă-butanol din napi, era proiectată construirea unei unități de producție analoagă dar alimentată cu paie (o investiție de 40—60 milioane de franci pe cinci ani) și a unui gazogen de 10 tone pe oră, destinat producerii metanolului din lemn (o investiție de 40—50 milioane de franci pe cinci ani).

În 1980, India a produs, din fermentația melaselor, șase milioane de hectolitri de etanol, dintre care 800 000 erau utilizați în industria chimică.

În Japonia, un proiect guvernamental se referea la producerea de alcool-carburant din trestie de zahăr, avînd ca obiectiv pe termen lung satisfacerea unei treimi din nevoile de benzină. Pe de altă parte Ministerul Industriei și Comerțului Exterior (MITI) a dedicat, în 1981, 12 miliarde de yeni pe o perioadă de șapte ani unui proiect de cercetări asupra producției de alcooli-carburanți din subproduse agricole, cum sînt paiele de orez, resturile lemnoase de trestie de zahăr și talașul. Puternica firmă Kyowa Hakko Kogyo, specializată în industria chimică, tehnologii avansate de fermentație și producerea de interferoni, urma să primească a treia parte din fondurile consacrate acestui proiect.

Japonia proiecta, de asemenea, cooperarea cu țările Asiei de Sud-Est în scopul construirii de uzine pentru fabricarea alcoolilor-carburanți din manioc, igname și alte produse agricole. Conform opiniei unor experți japonezi, o producție anuală de 100 de milioane de kilolitri de alcooli-carburanți (echivalentul a peste o treime din volumul importurilor japoneze de petrol) în Asia de Sud-Est nu era de loc o utopie (Cosse-Maniere, 1981).

În Filipine, un program de construire a 10 uzine pentru producerea de alcool-carburant din biomasă a fost lansat în 1981. Realizarea primelor trei unități, avînd fiecare o capacitate de producție zilnică de 1 200 hectolitri, a fost încredințată unor grupuri industriale germane și braziliene.

Australia a aprobat, în 1980, o finanțare de 1,1 milioane dolari pentru a încuraja cercetările privind producerea de etanol din zahăr din sfeclă sau trestie.

Noua Guinee—Papua a optat, de asemenea, pentru producerea de alcool-carburant (15% etanol amestecat cu benzină). Obiectivul este de a produce, în 1990, 130 de milioane de litri pe an de etanol din manioc, melase și sago.

Producerea de biogaz

Fermentația metanică sau biometanogeneza este o veche filieră de transformare energetică a biomasei, de vreme ce ea a fost evidențiată încă din 1776 de către Volta, care a descoperit metanul în gazul din mlaștini. Biogazul produs prin acest proces este într-adevăr un amestec de 65% metan, 30% dioxid de carbon, 1% acid sulfhidric (H_2S), urme de azot, oxigen, hidrogen și monoxid de carbon. Denumit și gaz de mlaștini, klar-gas, carburant derivat din reziduuri (refuse derived fuel, RDF), feu follet, gobar gas, el este inodor și arde cu o flacără albastră, fără fum; arderea nu incomodează pe cei care sînt obișnuiți cu folosirea, drept combustibili, a lemnului de foc, a dejecțiilor de rumegătoare sau a resturilor de bucătărie. Energia a 28 m^3 de biogaz este echivalentă cu cea a 16,8 m^3 de gaz natural, a 20,8 l de benzină, sau cu cea a 18,4 litri de carburant diesel (DaSilva, 1980).

Natura biochimică și microbiologică a procesului

Biometanogeneza cuprinde trei faze: solubilizarea și hidroliza constituenților organici, acidogeneza și metanogeneza. Prima fază nu se termină niciodată în operațiile de metanogeneză a deșeurilor, deoarece ea ar necesita o durată prea mare; transformarea energetică nu interesează în cele din urmă decît jumătate din materia organică — 1 800 kcal/kg de materii uscate, în loc de 4 000 kcal obținute prin procedee termochimice — însă reziduul fermentației metanice prezintă un interes agronomic, de vreme ce poate servi drept îngrășămînt. Trei grupuri de bacterii intervin în acest proces: primele transformă substraturile organice complexe în acizi butiric, propionic și lactic; cele secunde sînt bacterii acetogene, care transformă acești acizi organici în acid acetic, hidrogen și dioxid de carbon; bacteriile metanogene reduc dioxidul de carbon la metan și consumă hidrogenul, care, astfel, ar inhiba bacteriile acetogene. În 1967, Bryant ș.a. au descoperit că organismele acetogene și metanogene formau o asociație simbiotică pînă atunci considerată ca un singur microb, desemnat sub numele de *Methanobacillus omelianskii*.

Din punct de vedere biochimic, „fermentația" metanică este, de fapt, un tip de respirație anaerobă, în care electronii provenind din substraturi organice ajung în cele din urmă la dioxidul de carbon, care este apoi redus la metan (într-o fermentație, cea care acceptă în final electroni este o moleculă organică, redusă pentru a da produsul caracteristic al fermentației: astfel, aldehida etilică este redusă la alcool etilic în fermentația alcoolică). Pe lîngă substraturi organice diverse (ca acetatul), hidrogenul, care este produs de mai multe tipuri de bacterii anaerobe în sol, servește drept donor de electroni pentru metano-bacterii (Loll, 1978; Schlegel, 1978).

Pe de altă parte, este interesat de remarcat că unii compuși aromatici pot fi la originea metanului, în condiții de strictă anaerobioză. Acest proces este probabil foarte răspîndit în natură, mai ales în tratarea apelor uzate și a afluenților, precum și în transformarea anumitor biocizi. Observațiile lui

Ferry și Wolfe (1976, în Evans, 1977) au stabilit intervenția mai multor specii microbiene responsabile de diferitele etape ale degradării nucleilor aromatici pînă la acetat, care este unul dintre substraturile metanobacteriilor (adică dezhidrogenarea sa furnizează electronii necesari reducerii dioxidului de carbon la metan):

$$4\ C_6H_5COOH + 24\ H_2O \longrightarrow 12\ CH_3COOH + 4\ HCOOH + 8\ H_2O$$

(benzoat)

$$12\ CH_3COOH \longrightarrow 12\ CH_4 + 12CO_2$$

(acetat)

$$4\ HCOOH \longrightarrow 4\ CO_2 + 4H_2$$

(formiat)

$$3\ CO_2 + 12\ H_2 \longrightarrow 3\ CH_4 + 6\ H_2O$$

$$4\ C_6H_5COOH + 18\ H_2O \longrightarrow 15\ CH_4 + 13\ CO_2$$

Printre speciile bacteriene, *Methanobacterium formicicum* și *Methanospirillum hungati* păreau predominante și au putut fi izolate, în cultură pură, de către cercetători. Nucleul benzenic era mai întîi redus, apoi clivat în acizi alifatici de microorganisme gram-negative; acești acizi erau apoi transformați în substraturi utilizate de metanobacteriile propriu-zise; electronii produși dădeau probabil hidrogen, care reducea CO_2 la CH_4. Descompunerea în anaerobioză a nucleului benzenic în metan nu este sistematică: în felul acesta, în rumen, benzoatul și aminoacizii aromatici nu dau metan, care este produs prin degradarea la celuloză; ei se regăsesc în urină sub formă de hipurat și alte substanțe înrudite. În condiții naturale, compușii aromatici provin din descompunerea lentă a taninurilor și a ligninei, realizată în general de către enzime microbiene extracelulare. Deoarece lignina și taninurile constituie o parte considerabilă a materiei organice din sol, metanogeneza pornind de la acești polimeri apare ca un proces important al ciclului carbonului în biosferă (Evans, 1977).

Caracteristici comune tuturor metanobacteriilor sînt proprietatea de a crește în prezența hidrogenului și a dioxidului de carbon și sensibilitatea lor foarte mare privitoare la oxigen și la inhibitori ai producerii metanului. Eterogenitatea în interiorul acestei grupe de microorganisme este totuși evidentă pe plan morfologic: sarcine, coci, bacili și spirili. Peretele celular de *Methanosarcina barkeri* nu are peptidoglucan și nu conține nici acid muramic, nici acid D-glutamic; cel de *Methanobacterium*, susa MOH, și de *M. ruminantium* nu mai conține acid muramic și diferă de cel de *Methanosarcina*. Patru specii de metanobacterii din șase sînt chimiolitoautotrofe, reducînd dioxidul de carbon cu ajutorul hidrogenului, pentru a sintetiza metanul și substanța lor celulară.

O nouă bacterie metanogenă, *Methanobacterium kadomensis* St23, a fost izolată de firma japoneză Matsushita Electric Industrial Co., care a pus la punct cultura în masă a acestei sușe și care urma să o utilizeze la scară industrială într-o uzină pilot la Universitatea din Ryukyu. Această metanobacterie era capabilă să efectueze o metanogeneză în opt zile față de cele 20 de zile cerute în cazul procedeelor curente.

Metanobacteriile sînt, în condiții naturale, strîns asociate de bacteriile producătoare de hidrogen; este vorba în acest caz de o asociație trofică, cu beneficiu reciproc. Primele, folosind hidrogenul gazos produs de cele secundare, îl împiedică pe acesta să atingă concentrațiile toxice pentru cele secunde.

Modalități de producere a biogazului

Fermentația metanică se desfășoară într-un recipient cilindric etanș (fermentator) avînd o deschidere laterală pe unde se introduce substanța fermentescibilă; deasupra fermentatorului se află un recipient cilindric din oțel care servește la strîngerea gazului și care plutește ca un clopot deasupra amestecului în curs de fermentare, astfel încît să se evite accesul aerului, deoarece procesul trebuie să fie strict anaerob. Clopotul de gaz este cel mai adesea echipat cu o canalizare care permite recoltarea biogazului. Fermentatoarele sînt construite din cărămizi de argilă, din ciment sau din oțel. Clopotul servind la strîngerea gazului poate fi făcut din nailon și se adaptează foarte ușor la fermentator. Producerea de gaz face să se umple sacul de nailon care este legat la un compresor pentru a spori presiunea gazului (Barnett ș.a., 1978, DaSilva, 1980).

În cazul deșeurilor domestice sau textile raportul între substanța solidă și apă trebuie să fie de 1/1 (100 kilograme de deșeuri la 100 kilograme de apă), ceea ce corespunde unei concentrații totale de substanțe solide de ordinul a 8–11% din greutate).

Amestecul de substanțe fermentescibile este în general însămînțat cu bacterii acetogene și metanogene, sau chiar cu resturi provenind din alt fermentator. Un *p*H inferior inhibă creșterea bacteriilor metanogene și încetinește producerea biogazului, ca și supraîncărcarea fermentatorului; aciditatea poate fi redusă prin adăugarea oxidului de calciu, fermentarea fiind optimă în preajma unui *p*H neutru (între 6,0 și 8,0). Temperatura optimă a procesului este funcție de proprietățile mezofile sau termofile ale microorganismelor (30...40°C sau 50...60°C); variațiile bruște de temperatură sînt destul de nefavorabile. Fermentatoarele sînt în general îngropate pentru a profita de izolația conferită de sol; în climatele reci, fermentatorul poate fi încălzit de căldura produsă de instalațiile de compost din deșeuri agricole. Pe plan nutrițional, un exces de azot determină producerea de amoniac, care inhibă dezvoltarea bacteriilor. Un raport C/N de ordinul 30/1 din greutate favorizează o macerare optimă. Acest raport este modificat prin amestecarea de substraturi bogate în azot cu substraturi bogate în carbon: astfel, raportul C/N al bălegarului poate fi modificat prin adăugarea de paie sau de deșeuri lemnoase. Deșeurile din industriile agroalimentare se caracterizează printr-un conținut ridicat de carbon (aproximativ 50 de grame de carbon pe litru, ca în cazul reziduurilor de la distilarea sfeclei) și acestea se pretează cu atît mai mult „fermentației" metanice cu cît unele dintre ele sînt produse la o temperatură total favorabilă desfășurării procesului.

Pe de altă parte, este bine să se agite suspensia de substanțe materiale fermentescibile pentru a împiedica o stratificare ce inhibă fermentația: substanțele solide trebuie fragmentate pentru a evita formarea unei îngrămădiri care se opune producerii metanului. Durata de macerare normală

a baligii de bovine este cuprinsă între două și patru săptămîni, în timp ce, după cum susțin cercetătorii de la Rowett Research Institute (Scoția), dejecțiile de la porcine necesită vreo zece zile de fermentație, cele ale bovinelor și ale păsărilor- — vreo 20 de zile. În general, o macerare de 14 zile la 35°C este suficientă pentru a distruge aproape toate enterobacteriile patogene și enterovirușii, precum și 90% din populațiile de *Ascaris lumbricoides* și *Ancylostoma*.

Programul de activitate al Conferinței Națiunilor Unite pentru Știință și Tehnică în serviciul dezvoltării (1979) și Comisia Economică și Socială pentru Asia și Pacific au subliniat meritele unui sistem de agricultură integrat care utilizează biogazul.

Un astfel de sistem are ca scop să dezvolte culturile care produc substanțe alimentare și producția de proteine cu ajutorul culturilor de alge și prin creșterea peștilor, și să efectueze tratarea apelor uzate și transformarea diferitelor deșeuri (generatoare de îngrășămînt și energie sub formă de metan). Trebuie remarcat, în această privință, faptul că Africa, America Latină, Asia și Orientul Apropiat posedau aproape 38% din 950 de milioane de capete de vite care existau în lume (1979). În aceste regiuni se găsesc 72% din reziduurile de trestie de zahăr și 95% din cele provenind din banane, manioc, cafea și citrice. Materiile prime pentru fermentația metanică există deci în cantități considerabile (Da Silva, 1980).

Experiențele indiană și chineză

Producția de biogaz în mediu rural ocupă un loc prioritar în politica energetică a Indiei. Cercetări fundamentale și susținute sînt efectuate în special la Biochemical Engineering Research Center al Institutului Indian de Tehnologie. Perspectivele de dezvoltare ale unei asemenea producții sînt într-adevăr foarte importante: dacă cele 300 de milioane de tone de substanțe uscate din noroaie produse anual (1979) ar fi transformate în biogaz, energia disponibilă ar fi echivalentă cu 33 de milioane de tone petrol; această producție ar fi sporită și mai mult prin bioconversia deșeurilor (paie, resturi lemnoase etc.).

Al VI-lea Plan cincinal al Indiei (1980—1984) prevedea instalarea unui milion de fermentatoare care urmau să răspundă nevoilor domestice, instalare căreia îi era alocat un buget de 55 de milioane de dolari. O atare operație nu reprezenta decît 5% din posibilitățile oferite de transformarea baligilor de bovine, adică 18,75 de milioane de instalații familiale și 5,6 milioane de instalații colective. Gobar Gas Scheme, organism de dezvoltare și popularizare, acorda asistență tehnică producătorilor de biogaz și era însărcinat cu atribuirea de credite pentru construirea fermentatoarelor celor care aveau începînd cu 3—5 bovine, pentru a asigura nevoile unei familii de 4—5 persoane (Théry, 1981).

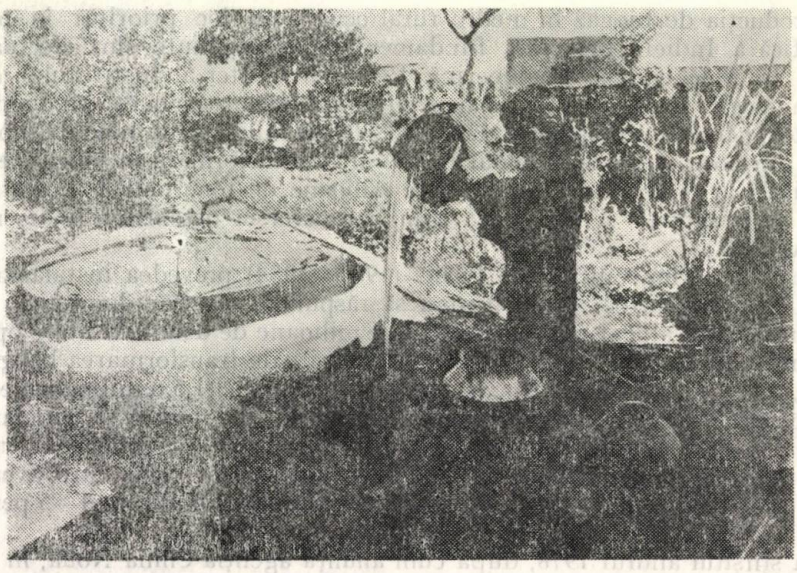
La sfîrșitul anului 1978, după cum anunța agenția China Nouă, în China funcționau aproape de 50 de ori mai multe instalații de biogaz decît în perioada Conferinței I Naționale asupra biogazului din 1975. În timpul celei de a II-a Conferințe Naționale asupra Biogazului, din august 1978, sursele oficiale indicau faptul că în China în 1980 urmau să funcționeze 20 de milioane

și în 1985—70 de milioane de instalații, iar la această din urmă dată 70% din familiile de țărani vor utiliza biogazul pentru nevoile lor de energie casnică (Smil, 1976; FAO, 1977; Smil, 1979).

Răspîndirea programului biogaz era favorizată de: reducerea inegalităților economice, creîndu-se multor familii posibilitatea să obțină un fermentator și instalația de creștere a porcilor corespunzătoare; descentralizarea industrială, avînd drept consecință construirea unor mici fabrici de ciment în majoritatea județelor, ceea ce înlesnea construirea de fermentatoare; utilizarea materialelor locale mai puțin scumpe (pietre, puzzolană, var); o politică activă de educare privind igiena mediului și combaterea poluării, indicîndu-se fiecărei comunități progresele ce trebuiau făcute. În plus, experiența aceasta, care folosea pe scară largă reziduuri ale recoltei agricole și deci biomasă celulozică, se situa la răspîntia activităților agriculturii, creșterii animalelor domestice și avicultur ii (Théry, 1981).

O asemenea politică necesită formarea intensivă de tehnicieni: între 1975 și 1980, peste 200 000 de tehnicieni au fost formați la diferite niveluri în provincia Sichuan. Aceștia îi formau, la rîndul lor, pe alții în vederea popularizării tehnicilor în comune, în brigăzi și în grupuri de familii (20—30) asociate în utilizarea biogazului. Institutele de cercetare provinciale răspund de lucrările de cercetare, ameliorări și inovații tehnice. Administratorii sînt formați, de asemenea, pentru a rezolva mai bine problemele de gestiune relative la sistemele de producere a biogazului, precum și la utilizarea gunoiului de grajd în aceste colectivități (Van Buren, 1980; PNUE, 1981).

Sprijinul acordat de guvern s-a materializat în crearea de birouri regionale și locale însărcinate special să urmărească dezvoltarea programului



Biometanogeneza și producerea de biogaz.
Fotografia reprezintă o cuvă de macerare care servește la producerea de biogaz pornind de la deșeuri diverse cărora li s-a adăugat apă. Este vorba despre un dispozitiv destinat să satisfacă nevoile de energie ale unei familii indiene din statul Haryana.
(Foto: M. Edwards, Earthscan, ianuarie 1979. În: Ambio (Stockholm), vol. 9, nr. 1, 1980, p. 3.

biogaz. Planul a prevăzut alocarea materialelor de construcție, indispensabile, în special a cimentului. În sfîrșit, pe plan economic, băncile de stat acordau împrumuturi cu dobîndă mică (0,18% pe an în 1979) pentru construirea instalațiilor de fermentare.

Conform Islam (1979), producția totală era de două miliarde de metri cubi de biogaz la 7,15 milioane de fermentatoare, la sfîrșitul anului 1978, circa 0,77 m^3 la un fermentator pe zi în șase luni de funcționare efectivă. Fermentatoarele aveau o capacitate a cuvei de 6—12 m^3 și un randament mediu de 0,15 m^3 de biogaz pe zi și pe m^3 de capacitate; durata anuală medie de producție era considerată 250 de zile, adică 1,12 m^3 de gaz pe zi și pe instalație de 7,47 m^3 capacitate medie de fermentator. Evaluările lui Théry (1981) conduceau la o producție puțin peste 2,5 miliarde de m^3 biogaz pe an (adică 1,5 miliarde tone echivalent petrol).

La sfîrșitul anului 1978, 7,15 milioane de instalații de biogaz serveau unui procent de 5,26% din populația rurală a Chinei (850 de milioane; familii de cinci persoane), în timp ce 70 000 de unități nu serveau decît 0,06% din gospodăriile indiene (Islam, 1979). Distanța de la 1 la 100 — adică, la sfîrșitul anului 1979, de la mai puțin de 100 000 de unități în India la 10 milioane de unități în China s-a realizat într-un timp de două ori mai scurt în China, unde programul a început în 1972, în loc de 1962— în India (Théry, 1981).

În China există crescătorii permanente de porci, lucru care permite să se colecteze apoi să se transporte gunoaiele, sau să se construiască grajduri, a căror necesitate se impune în India, în satele unde vitele nu sînt închise în țarcuri. În schimb, trebuie remarcat faptul că, în China, șeptelul porcin produce mai puțină substanță fermentescibilă decît șeptelul bovin al Indiei, chiar dacă, la cantități egale, dejecțiile de porcine produc în plus aproximativ 50% biogaz.

În China nu există alte întrebuințări ale dejecțiilor de la animale, în timp ce în India bălegarul servește drept combustibil (aproape o treime din producție, în medie națională) și drept îngrășămînt organic.

În consecință, producția de biogaz prezintă în China avantajele unei surse de energie disponibilă, la scară familială și colectivă, ale unui îngrășămînt de calitate și ale ameliorării igienei mediului; în India, prin arderea unei cantități mai mici de bălegar de vite, cantitatea de îngrășămînt ar putea fi sporită și, secundar, furnizarea de energie și igiena mediului ar fi ameliorate considerabil.

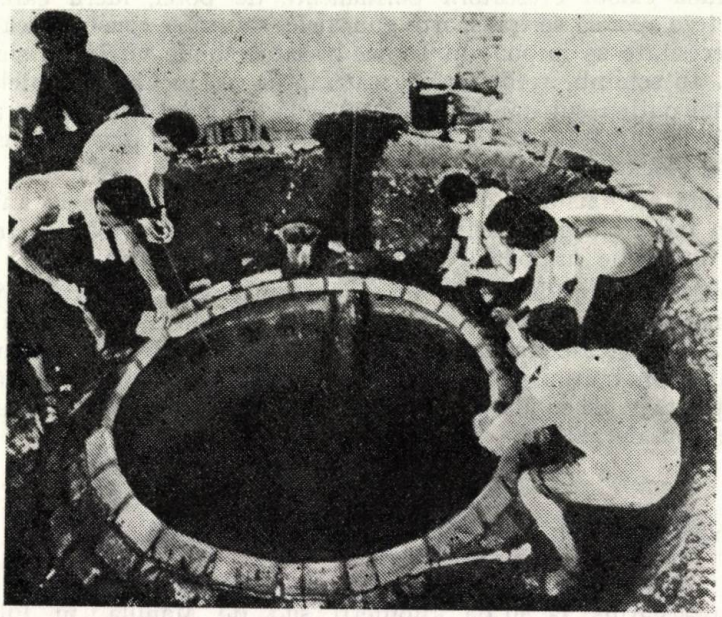
Alte experiențe

La Maya Farms, la 40 de kilometri sud de Manilla, în Filipine, se află un complex de 48 de instalații de producere a biogazului care utilizau dejecțiile de la 15 000 de porci. Gazul servea nevoilor energetice ale unei cantine, ale unei uzine de tratare a cărnii și ale unei fabrici de conserve; el mai servea și pentru punerea în funcționare a pompelor și generatoarelor Diesel care furnizau fermei apă și electricitate. Iluminarea, refrigerarea, fierberea alimentelor, spălătoria depindeau și ele de furnizarea de biogaz. Pe de altă

parte, analiza nămolurilor reziduale ale fermentației a pus în evidență o concentrație însemnată de vitamină B_{12}, ceea ce justifica incorporarea lor în rația alimentară a porcilor.

În Guatemala, El Centro Mesoamericano de Estudios Sobre Technologia Apropriada (CEMAT) a instalat, în 1953, o unitate capabilă să producă 10 m³ de biogaz pe zi. Apoi a fost creată o societate comercială (Abiogasco). Ea dispunea de o unitate mobilă, la fel cu aceea construită la Mazatenango, o unitate producînd 90 m³ de biogaz pe zi și 900 tone îngrășăminte organice pe an, din deșeuri de cafea; gazul servea la acționarea unui motor de 35 CV, care decortica boabele de cafea într-un ritm de 3 t/h, producea 1 500 W și acționa un compresor. În 1959, o unitate industrială era instalată pentru a produce 2 270 de tone de îngrășăminte, dar gazul nu era utilizat. În 1978 a fost terminată construcția unei uzine prevăzută pentru producerea a 8 000 m³ de gaz pe zi (echivalentul a 9 500 de litri de benzină), din bălegar de vite; costul acesteia a fost de 1,5 milioane de dolari. CEMAT promova, de asemenea, o politică de extindere a instalațiilor de biogaz la scară familială.

În Israel, Kibbutz Industries Association (KIA) s-a interesat de producția de biogaz din 1974. Cercetări fundamentale asupra procesului metanogenezei au fost întreprinse atunci cu participarea activă a mai multor instituții de cercetare universitare și industriale și cu sprijinul Ministerului Energiei. Fermentarea anaerobă se desfășoară la temperatura de 55°C. Cercetătorii israelieni au reușit sporirea cantității de biogaz produse, care era cuprinsă



Construirea în China a unei cuve de fermentare care servește la producerea de biogaz.

Cuva este construită din cărămizi și acoperișul este ridicat fără eșafodaj. Canalizarea care permite alimentarea cuvei se observă în mijlocul fotografiei.

[Foto: A. Van Buren/UNEP, Nairobi, În: Ambio (Stockholm), vol. 9, nr. 1, 1980, p. 13.]

Cupola unei cuve de fermentare din ciment, îngropată, avînd un volum de aproximativ 10 m³ (China).
Pe deschiderea circulară din vîrful cupolei vor fi plasate dispozitivele de recuperare a biogazului produs prin biometanogeneză.
[Foto: de Silva/UNEP, Nairobi. În: Ambio (Stockholm), vol. 9, nr. 1, 1980, p. 14.]

între 4 și 6,5 m³/zi pentru fiecare metru cub de volum al cuvei de fermentare (adică un randament de 10 ori mai mare față de cel obținut în mod curent). Biogazul era compus din 62% metan și 38% dioxid de carbon, a cărui utilizare în sere era proiectată pentru creșterea intensității fotosintetice a plantelor cultivate.

Reziduul fermentării care conținea numai 12% substanțe solide, servea la alimentarea peștilor și putea să înlocuiască astfel pînă la 50% din granulele pe bază de cereale utilizate în general în piscicultură. Experiențele făcute pe bovine și ovine au arătat că acest reziduu, bogat în proteine, în elemente minerale și în vitamine, putea fi consumat de vite și putea înlocui aproape 25% din substanța uscată a rației alimentare.

O uzină pilot, cu o capacitate de fermentare egală cu 200 000 de litri a funcționat timp de trei ani în această fermă din Galileea de Sus, apoi prima uzină de mari dimensiuni a fost inaugurată în 1982, la sud de Ashkelon. Amortizarea acestei uzine urma să se producă în mai puțin de opt ani dacă metanul ar fi înlocuit numai carburantul Diesel, și în trei ani dacă metanul ar fi înlocuit gazele propan și butan utilizate în economia domestică. Perioada de amortizare era și mai scurtă dacă se ținea cont de valoarea comercială a reziduului fermentării.

Conform studiilor făcute în Israel, construirea unui număr de aproape 460 de uzine de producere de biogaz ar fi justificată, fără a le mai socoti pe cele care ar fi vîndute și altor țări (în 1982, prima uzină construită, avînd

valoarea de 330 000 de dolari, urma să fie livrată unei importante societăți agricole italiene).

În Europa occidentală, s-a înregistrat o reînnoire a interesului pentru fermentația metanică. În Franța, de exemplu, după ce aproape 2 000 de instalații țărănești datînd din al doilea război mondial fuseseră abandonate, biometanogeneza este din nou studiată și procedeul ameliorat datorită lucrărilor realizate la Institutul Național al Cercetării Agronomice și la Institutul Național pentru Cercetări Chimice Aplicate (IRCHA). Se puteau obține, astfel, 0,45 m^3 de biogaz (0,23 m^3 de metan) pe kilogram de substanță uscată (la un ciclu de fermentație de șase săptămîni, producția era de 70—75 m^3 de biogaz pe tonă de gunoi de grajd, adică echivalentul a 45 de litri de combustibil casnic). Așadar cu 30 de bovine sau 500 de porci, puteau fi satisfăcute nevoile unei exploatări agricole medii (Chartier și Mériaux, 1980). Comisariatul Francez pentru Energia Solară (COMES) a hotărît, în 1981, să întreprindă operațiuni de răspîndire și promovare a instalațiilor de biogaz în mediu rural. Un număr de 30 de instalații de biogaz de mare amploare urmau să fie instalate cu ajutorul a 20 de industriași pentru a lansa încă de la sfîrșitul anului 1982 o acțiune de „răspîndire — amorsare", avînd ca obiect în jur de 100 instalații de biogaz, a căror cumpărare urma să fie finanțată în parte de COMES. Acest program era favorizat de progresia rapidă a creditelor alocate operațiunilor de răspîndire întreprinse de COMES (30 de milioane de franci în 1981, 70 de milioane în 1982 și 240 de milioane în 1985, pentru ansamblul activității comisariatului).

Metanizarea continuă, în general aplicată materialelor cu încărcătură organică redusă — reziduuri textile, efluenți urbani sau agroindustriali — putea fi aplicată și bălegarului. În cazul efluenților agroalimentari, acest proces făcea posibilă obținerea a 0,60 m^3 de biogaz cu 60% metan pe kilogram de substanță organică, înlocuind astfel, în mod avantajos, epurarea aerobă a acestor efluenți, care consumă multă energie (1 kWh pe kg de carbon organic), și asigurînd acoperirea nevoilor energetice ale unității de epurare (Chartier și Mériaux, 1980).

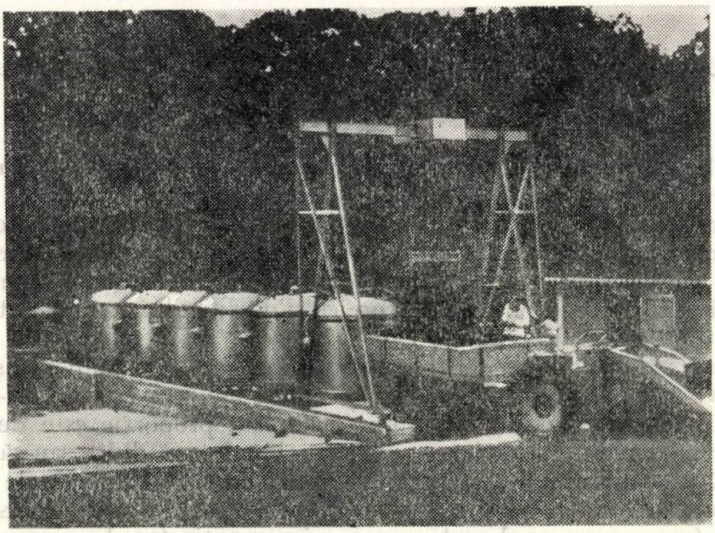
Concluzii

Producția de biogaz pornind de la „fermentația" metanică a deșeurilor și reziduurilor disponibile pe plan local este unul dintre răspunsurile date nevoii de energie din majoritatea zonelor rurale ale țărilor în curs de dezvoltare. În cazul bălegarului, de exemplu, numai un sfert din materia organică servește la producerea de biogaz, dar energia calorică produsă astfel este cu 20% mai mare decît cea obținută prin arderea întregii cantități de bălegar.

Rămîneau de pus la punct cîteva probleme de natură biochimică, microbiologică și socială pentru asigurarea extinderii pe scară largă și a succesului economic al instalațiilor de biogaz. Ameliorările se referă, de exemplu, la următoarele domenii: reducerea elementelor de oțel în instalațiile curente; proiectarea optimă a instalațiilor; punerea la punct a unor arzătoare eficace; încălzirea solară a instalațiilor; cuplarea sistemelor de biogaz la alte surse de energie neconvențională; conceperea unor instalații de mari dimensiuni

pentru comunitățile sătești sau urbane; utilizarea optimă a bălegarului macerat; ameliorarea procesului de fermentație și cel al degradării inițiale a reziduurilor.

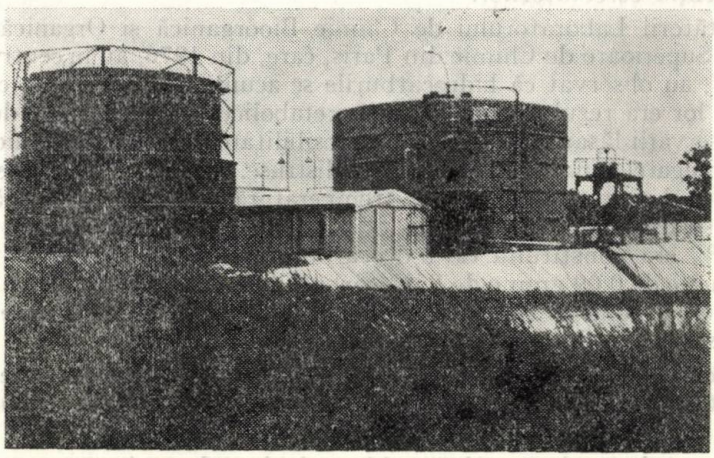
Au fost reliefate dificultățile referitoare la adoptarea, de către comunitățile rurale, a acestui nou combustibil și a modului său de producție, în



Producerea de biogaz.

Baterie formată din șase fermentatoare experimentale aparținînd Institutului Național al Cercetării Agronomice din Franța, la centrul din la Minière, lîngă Versailles.

[Foto: INRA].



Producerea de biogaz.

Fermentator industrial pentru producerea continuă de biogaz pornind de la dejecții de porcine (Châtillon-en Vendelais, Ille-et-Vilaine, Franța.)

[Foto: Olivier Sébart (INRA).]

special la nivelul unei familii. Experiența arată de fapt că programele de răspîndire bine conduse și angajarea unor factori de decizie sînt suficiente pentru a cîștiga adeziunea populației interesate, căreia i se poate prezenta avantajul dublu al acoperirii nevoilor energetice și al protecției mediului înconjurător.

Producerea de hidrocarburi cu ajutorul lui Botryococcus braunii

Din 1978 s-au făcut cercetări asupra prezenței, în seva anumitor specii de plante (în special *Euphorbiacee*), de hidrocarburi care ar putea să înlocuiască petrolul, în special pentru extracția de materii prime folosite în industria petrochimică. Concentrația acestor hidrocarburi regenerabile era totuși redusă în raport cu greutatea plantei întregi și exploatarea lor se împiedica de unele probleme de rentabilitate economică și de dificultatea în a putea dispune de plantații suficient de întinse.

O specie de algă unicelulară, *Botrycoccus braunii*, pare totuși să ofere perspective interesante: hidrocarburile constituie într-adevăr 15—75% din greutatea substanței uscate, în timp ce această proporție este de ordinul a 1% la anumite plante superioare. Această algă de apă dulce sau sărată poate fi întîlnită atît în regiunile cu climă temperată cît și tropicală, unde înmulțirea ei pe suprafețele apelor poate fi de-a dreptul spectaculoasă. Ea se prezintă sub două forme, care se deosebesc prin pigmentație (verde sau roșie) și prin structura hidrocarburilor sintetizate. Forma verde conține hidrocarburi liniare cu număr impar de atomi de carbon (25—31) și sărace în duble legături; forma roșie conține hidrocarburi avînd 31—38 atomi de carbon și bogate în duble legături, „batriococenele". Semnificația exactă a acestor două forme este în atenția cercetătorilor.

Cercetătorii Laboratorului de Chimie Bioorganică și Organică al Școlii Naționale Superioare de Chimie din Paris, care, din 1976, au în centrul atenției *B. braunii*, au observat că hidrocarburile se acumulau în peretele celulelor și că sinteza lor era rezultatul activității metabolice a algei în faza de creștere. Aceste observații lăsau să se întrevadă posibilitatea extragerii de hidrocarburi prin centrifugare, fără ca celulele să fie distruse. Cercetătorii francezi au reușit, modificînd condițiile de cultură (temperatură, lumină), să obțină o dublare a biomasei din alge în două zile în loc de șapte, cu celule din a căror substanță uscată 35% era constituită de hidrocarburi. Un astfel de rezultat echivala cu o producție de 0,09 grame de hidrocarburi pe litru de mediu de cultură și pe zi, sau de 60 de tone pe hectar și pe an la o cultură de alge crescute în condițiile unei suprafețe de apă naturală sau artificială.

Compoziția hidrocarburilor produse de *B. braunii* este cea care ar putea servi drept sursă de energie sau de materii prime pentru petrochimie (în mod direct sau ca urmare a unui cracaj ușor).

Rămîneau de rezolvat multe probleme înainte de proiectarea unei exploatări pe scară largă: elucidarea rolului bacteriilor care trăiesc în asociație cu alga și dintre care unele favorizează producerea hidrocarburilor, lupta împotriva speciilor de alge concurente și împotriva paraziților în condițiile naturale;

controlul factorilor mezologici în vederea unei producții optime. Obstacolele de natură economică erau la fel de importante și cercetătorii francezi considerau că ar trebui să se orienteze către utilizarea hidrocarburilor algei în fabricarea substanțelor cu mare valoare adăugată, pentru care costul materiei prime nu joacă un rol preponderent (de exemplu, produse farmaceutice sau cosmetice).

Studiul acestor probleme și ameliorarea randamentelor culturilor urmau să fie înlesnite prin instalarea, la Centrul de Studii Nucleare din Cadarache (în sud-estul Franței), a unei unități-pilot de cultură, unde algele vor fi cultivate în tuburi de materiale plastice transparente, conținînd mediul nutritiv și jucînd rolul captatorilor solari (un astfel de sistem seamănă cu cel utilizat la cultura spirulinelor, v. pag. 179).

Cercetările referitoare la extracția și utilizarea eventuală a hidrocarburilor de *B. braunii* ar putea să contribuie, de asemenea, la înțelegerea genezei petrolului. Combustibilii fosili provin din transformarea lentă, în sedimente, a materiei organice, care suferă o degradare accentuată și al cărui reziduu se polimerizează pentru a forma o substanță insolubilă, kerogenul. Acesta se transformă în continuare sub efectul creșterii temperaturii și presiunii consecutive a sedimentelor; kerogenul pierde oxigenul și se îmbogățește cu carbon și hidrogen. Cercetătorii Școlii naționale superioare de chimie din Paris au propus să ia drept model peretele de *Botryococcus braunii* pentru simularea, sub efectul căldurii, a degradării materiei insolubile (kerogen) în petrol. Dacă s-ar reuși simularea genezei combustibililor fosili, atunci ar fi posibilă determinarea gradului de evoluție a unui kerogen extras dintr-o rocă mamă și evaluarea potențialului petrolifer al acesteia din urmă.

Bioenergie: fotoproducerea de hidrogen și conversia energiei luminii

La începutul anilor '60 era pusă în evidență producerea de hidrogen de către cloroplastele izolate de spanac, în prezență de donori artificiali de electroni și de extracte bacteriene conținînd o hidrogenază: donor de electroni $\xrightarrow{e^-}$ $\xrightarrow{e^-}$ fotosistem I $\xrightarrow{e^-}$ transportor de electroni $\xrightarrow[H^+]{e^-}$ hidrogenază $\longrightarrow H_2$.

Hidrogenaza primea electronii ferredoxinei; fotoliza apei de către cloroplaste era suprimată în această experiență, deoarece donorii de electroni organici constituiau sursa de hidrogen; numai fotosistemul I funcționa.

La începutul anilor '70, cercetătorii americani au constatat că cloroplastele de spanac și extractele bacteriene care conțineau o hidrogenază (în absența donorilor de electroni suplimentari) puteau produce hidrogen, cînd erau iluminate și cînd ferredoxina servea drept transportor de electroni. În acest caz, cele două sisteme fotochimice I și II ale cloroplastelor erau funcționale. Hidrogenaza extrasă din *Clostridium* era foarte sensibilă la oxigen și reacția era realizată într-o atmosferă de azot, în prezență de enzime și de compuși destinați recuperării oxigenului emis prin fotoliza apei (de exemplu, glucoz-oxidaza și glucoza). La un $p\mathrm{H} = 7$ și la o temperatură de 25° C, Hall ș.a. (1980)

au obținut, în aceste condiții, 50 micromoli de hidrogen pe oră și pe miligram de clorofilă, și aceasta timp de șase ore. În alte laboratoare, această producție putea dura zece ore sau chiar mai mult. Prezența oxigenului era principalul factor limitativ.

Interesul pentru această formă de producere a energiei rezidă în următoarele: substratul fotolizei (apa) este din abundență, sursa de energie (radiația solară) este nelimitată, hidrogenul poate fi depozitat, nu este poluant și are o putere calorică foarte ridicată (29 kcal/g față de 3,5 kcal/g în cazul glucidelor); procesul este în plus regenerabil, deoarece, cînd hidrogenul este consumat, substratul (apa) este regenerat; el se desfășoară, în sfîrșit, la niște temperaturi normale și nu produce compuși intermediari toxici.

Ameliorarea randamentului producerii de hidrogen consta în cercetarea hidrogenazelor mai puțin sensibile la oxigen; cea a hidrogenobacteriei *Alcaligenes* ce catalizează o producere lentă de hidrogen dintr-un amestec conținînd membrane de cloroplaste și dintr-un metil viologen ca transportor de electroni, dar nu din compuși destinați să recupereze oxigenul. Hall ș.a. (1980) au insistat asupra a trei aspecte importante: trebuia să existe o legătură strînsă între transportorul de electroni și catalizatorul responsabil cu emiterea de hidrogen; interacțiunea între membranele cloroplastice și transportoarele de electroni trebuia să fie eficace; transportoarele de electroni trebuiau să nu fie ușor oxidabile (ferodoxina și metilul viologen puteau, sub forma lor redusă, să reacționeze cu oxigenul și folosirea lor nu era foarte indicată atunci cînd avea loc fotoliza apei).

Durata producerii de hidrogen era mai ales limitată de stabilitatea cloroplastelor izolate. Degajarea de hidrogen ar putea fi stimulată prin adăugarea de cloroplaste intacte în amestecurile de reacție, dar cercetările asupra sistemelor fotochimice care catalizează fotoliza apei fac posibilă întrezărirea unor progrese. Astfel, Porter ș.a., de la Royal Institution din Londra (Hall ș.a. 1980) au reușit să prepare complecși de ftalocianină și de Mn-porfirină, capabili să producă oxigen și hidrochinonă din apă; Calvin, în laboratorul său din Berkeley, a arătat că cristale semiconductoare din oxid de zinc și complecși de substanțe colorante dădeau o reacție analoagă. Aceste două echipe de cercetători încercau să realizeze o fotosinteză artificială prin incorporarea acestor complecși în lipozomi și prin producerea unor reacții de transfer de sarcină de pe o parte pe cealaltă a unei membrane. Pentru a realiza fotosinteza *in vitro*, Calvin încerca să elaboreze două sisteme, unul care să producă prin hidroliză oxigen și un transportor de electroni redus, celălalt care să degaje hidrogen din transportorul redus și care să antreneze o reacție fotochimică. Pare să fi fost astfel realizată fotoliza artificială a apei, adică o reacție de tipul celei care face să intervină în cloroplaste fotosistemul II.

Fotochimiștii care lucrează în Franța, Elveția și U.R.S.S. au arătat că este posibilă producerea de hidrogen în prezența unui donor de electroni artificial (în locul apei) și de pigmenți fotosensibili (mai degrabă decît membrane cloroplastice). Pe de altă parte, fotoliza apei a fost realizată, pornind de la amestecuri conținînd compuși de ruteniu și alți catalizatori, cu ajutorul luminii vizibile și, într-unul din cazuri, a fost observată degajarea de hidrogen.

Producerea de hidrogen putea fi, de asemenea, datorată cianobacteriilor, a căror fotosinteză este aerogenă: la Universitatea din California (Berkeley), culturi de *Anabaena* sp. au putut produce oxigen și hidrogen timp de 19 zile,

dar aceste culturi păreau greu de folosit într-un sistem continuu de producere de hidrogen (Hall ș.a., 1980).

Dacă ar fi posibilă elaborarea unui sistem stabil capabil să producă hidrogenul prin fotoliza apei, primind 10^7 J/m²/zi (100 W/m²) de energie solară, producția ar fi de 90 l/m²/zi de hidrogen (sau 3 kg/m²/an de hidrogen, sau $400 \cdot 10^6$ J). Aceste 3 kg de hidrogen ar valora o liră sterlină la prețurile din 1980 și, pe o perioadă de 30 de ani, această producție ar aduce 30 de lire pentru fiecare metru patrat din suprafața consacrată transformării energiei (Hall ș.a. 1980).

În concluzie, punerea la punct a unui sistem fotochimic, stabil și eficace, care acoperă funcțiile fotosistemului II al cloroplastelor, un sistem care catalizează fotoliza apei și reduce un transportor de electroni, constituie o etapă esențială a procesului de conversie a energiei solare în hidrogen. În ceea ce privește degajarea hidrogenului dintr-un transportor sau dintr-un catalizator redus, ea nu pune probleme de nerezolvat, totuși, sensibilitatea acestui transportor la oxigen poate să-i limiteze utilizarea. Ar trebui să existe posibilitatea dispunerii de o substanță care să joace același rol ca hidrogenaza, adică rolul unui transportor de electroni și de protoni stabil față de oxigen.

Alte mecanisme de conversie a energiei efectuate de microorganisme ar putea da naștere unor aplicații biotehnologice. Bacteria halofilă *Halobacterium halobium* este capabilă să utilizeze energia luminoasă prin intermediul unui pigment purpuriu, bacteriorodopsina, care se află în membrana celulară. Acest pigment este constituit dintr-un lanț protidic unic, de care este legată o moleculă de retinaldehidă. Ca și purpura retiniană, un derivat al vitaminei A, el este partea fotosensibilă a pigmentului. Radiația solară determină, în moleculele de bacteriorodopsină, modificări fizico-chimice care se traduc în ultimă instanță prin transferuri de protoni de pe o parte a membranei pe cealaltă parte. Pigmentul se comportă ca o pompă cu protoni pusă în mișcare de energia luminoasă iar totalitatea transformărilor care intervin la nivelul moleculei de bacteriorodopsină durează 10 milisecunde; după fiecare „fotociclu", molecula este din nou gata să fie activată de radiația solară și să asigure pomparea unui alt proton. Moleculele de bacteriorodopsină sînt grupate cîte trei în membrana celulară și aceste grupe fac parte dintr-o rețea hexagonală; în fiecare grupă, cele trei molecule funcționează sinergic. Moleculele de bacteriorodopsină își pot îndeplini funcția chiar dacă celulele bacteriene sînt distruse; nu trebuie totuși să se dezorganizeze asamblarea lor (Prentis, 1981).

Pomparea protonilor printr-o membrană (fie în cazul unei celule vii, fie al unei membrane izolate) are ca efect stabilirea unui gradient de concentrare, deoarece protonii sînt mai concentrați către interiorul celulei și mai puțin concentrați către exterior. Acest gradient poate fi măsurat prin diferența de *p*H sau prin diferența de potențial electric, astfel încît este vorba de un gradient electrochimic.

Biochimiști și biofizicieni din mai multe țări (S.U.A., Ungaria, Israel, Olanda, R.F.G., Marea Britanie și U.R.S.S.) au încercat să incorporeze ansamblurile moleculare de bacteriorodopsină în sisteme artificiale, a căror eficacitate s-a dovedit inferioară celei a altor procese de utilizare a energiei solare. Unii cercetători au considerat că eficacitatea sistemelor cu membrane de *Halobacterium halobium* trebuia sporită de patru ori pentru a putea rezista comparației cu captatorii fizici, de exemplu (Prentis, 1981).

În orice caz, au fost elaborate în laborator sisteme cu membrane care produceau curent electric. Aceste sisteme, spre deosebire de celulele pe bază de siliciu, de arseniat de galiu sau sulfură de calciu, nu ar necesita nici o tehnologie avansată, nici investiții importante (Prentis, 1981).

Cultura de *Halobacterium halobium* se poate realiza în bălțile cu adîncime mică unde concentrația de clorură de sodiu și de alte săruri minerale este ridicată; în măsura în care este vorba de un mediu foarte selectiv, contaminarea microbiană este nesemnificativă. Nevoia de oxigen a bacteriilor este redusă, deoarece, într-adevăr, biosinteza rodopsinei are loc în condiții de concentrație mică de oxigen. În anumite sușe de *Halobacterium halobium*, jumătate din suprafața membranoasă este acoperită de pigment, astfel încît un volum de 10 litri de cultură bacteriană face posibilă producerea a 0,5 grame de membrane pigmentate; fragmentele membranare conțin pînă la 100 000 de molecule de bacteriorodopsină care trebuie fixate pe suporturi în așa fel încît acțiunea lor sinergică să nu fie alterată; suportul trebuie să aibă proprietățile fizice, chimice și electrice care să favorizeze trecerea protonilor, dar nu și a celorlalți ioni (Prentis, 1981). O tehnică promițătoare constă în fixarea membranelor purpurii pe suporturi poroase, anterior impregnate cu lipide, astfel încît lipidele și membranele să se asocieze pentru a forma o peliculă uniformă la suprafața suportului. Membranele pot fi, de asemenea, amestecate cu acid acrilic sau cu acrilamidă, și amestecul este polimerizat într-un gel. Funcționarea oricăruia dintre aceste sisteme este funcție de orientarea moleculelor de bacteriorodopsină, care trebuie să pompeze protonii în aceeași direcție. În loc să fie asociate în ansambluri orizontale, moleculele de bacteriorodopsină și de lipide pot fi unite în proteolipozomi, care ulterior pot fi incorporați în sisteme capabile să asigure o pompare eficace a protonilor (Prentis, 1981).

H. halobium se caracterizează prin existența unui alt tip de „pompă", deosebită de cea care deplasează protonii; substanța responsabilă este halorodopsina, care utilizează energia luminoasă pentru a pompa în mod direct ionii de sodiu. Purificarea unui astfel de sistem ar putea fi urmată de folosirea lui în desalinizarea apei (Prentis, 1981).

Chiar dacă folosirea membranelor pigmentate de *Halobacterium halobium* în scopul producerii de energie va mai necesita intense cercetări și soluționarea a numeroase probleme tehnice, nu există, în schimb, nici o îndoială că studierea acestor sisteme de conversie a energiei va face posibilă elucidarea în mod treptat a mecanismelor moleculare în cauză, pentru a se trece apoi la cercetări în vederea elaborării unor sisteme artificiale la fel sau chiar mult mai eficiente. Din acest punct de vedere, lucrările realizate asupra pigmenților fotosensibili sînt comparabile cu cele avînd ca obiect fotoproducerea hidrogenului de către amestecuri de reacție mai mult sau mai puțin artificiale.

Pe lîngă tehnicile industriale agroalimentare și farmaceutice clasice, care de decenii folosesc microorganismele cele mai diverse, proiectele mai recente de a transforma culturile microbiene și celulare în agenți depoluanți, în recuperatori de minereuri, în producători de energie, de proteine, de hormoni și de substanțe medicamentoase au stîrnit un viu interes în multe țări și mobilizarea unor resurse importante pentru crearea de bioindustrii, în timp ce erau create, de asemenea, un mare număr de societăți cu vocație bioindustrială. Chiar dacă trecerea la stadiul industrial nu este întotdeauna o realitate economică și chiar dacă este greu de făcut pronosticuri, ar fi dificil să nu fim de părerea specialiștilor care susțin că elaborarea noilor tehnici de recombinare genetică reprezintă o adevărată revoluție cu însemnate consecințe practice și industriale. Și, de fapt, investițiile făcute în bioindustrie de marile grupuri internaționale miniere, chimice, petroliere sau farmaceutice sînt considerabile, ele finanțînd propriile cercetări sau pe cele ale unor societăți de inginerie genetică, ce lucrează în strînsă colaborare cu cercetători și institute de cercetare publice, adesea acționare ele însele.

Către guvernele mai multor țări au fost făcute rapoarte privind viitorul biotehnologiilor și microbiologiei aplicate, din partea unor echipe de cercetători eminenți sau a unor instituții de cercetare, pentru a atrage atenția factorilor responsabili asupra unui domeniu de viitor și a le determina să acționeze în direcția investițiilor indispensabile, cît și a unei politici de formare a cadrelor necesare și de orientare a cercetărilor (tabelul 11). Aceste rapoarte

Tabelul 11. **Principalele rapoarte asupra biotehnologiilor (după Cantley și Sargeant, cf. Salomon, 1982)**

1976	R.F.G.	DECHEMA (BMFT), *Biotehnologie, eine Studie über Forschung und Entwicklung*
1976	Japonia	MITSUI, *Present and future of enzyme technology*
1976	Marea Britanie	A. N. Emery, *Biochemical engineering*, Science Research Council
1977	Comisia comunităților europene	*Possible actions of the European Communities for the optimal exploitation of the fundamentals of the new biology in applied research*
1979	Franța	F. Gros, F. Jacob și P. Royer, *Sciences de la vie et société, Raport au président de la République*, Paris, Documentația franceză
Septembrie 1979	Franța	J. de Rosnay, *Biotechnologies et bio-industrie*, anexă la raportul *Sciences de la vie et société*, Paris, Institutul Pasteur

Tabelul 11 (continuare)

Ianaurie 1980	R.F.G.	BMFT Leistungsplan 04, *Biotechnologie*
Martie 1980	Marea Britanie	*Biotechnology : a report of a joint party* (Advisory Council for Applied Research and Development/Advisory Board for the Research Councils/The Royal Society), Spinks report
Mai 1980	Belgia	SPPS, *Développements en matière de biotechnologies*
Septembrie 1980	Canada	Miller ș.a., *Biotechnology in Canada : promises and concerns*, Institutul de cercetări politice și Consiliul Științei ale Canadei
Februarie 1981	Canada	*Biotechnologie : un plan de dévelopement pour le Canada/ Biotechnology : a development plan for Canada*, Rapport du Groupe d'étude sur la biotechnologie au ministre d'État pour la science et la technologie (Report to the Minister for Science and Technology).
Februarie 1981	Franța	J. C. Pelissolo, *La biotechnologie, demain?*, Paris, Documentația franceză
Martie 1981	Marea Britanie	*Biotechnology* (response to Spinks Report), Government White Paper.
Aprilie 1981	S.U.A.	O. Zaborsky, *Biotechnology at the National Science Foundation*
Aprilie 1981	S.U.A.	*Impacts of applied genetics : micro-organisms, plants and animals*, a report by the Office of Technology Assessment, U. S. Congress
Mai 1981	Irlanda	NBST, *Biotechnology trends*
Mai 1981	Olanda	*Biotechnology : a Dutch perspective*, a report by the Netherlands Study Centre for Technology Trends, J. H. F van Apeldoorn ed.
Iunie 1981	Australia	*Biotechnology for Australia*, a report to the Executive of CSIRO by a Special Committee of Review
Iulie 1982	Franța	Mission des biotechnologies, *Essor des biotechnologies*, Paris, Ministère de la recherche et de l'industrie
Iulie 1982	Franța	G. Strain, *Les bio-industries et les societés nationales, un atout pour la France*, Paris, Ministère de la recherche et de l'industrie
1982	OCDE	A. T. Bull, G. Holt și M. D. Lilly, *Biotechnologie. Tendances et perspectives internationales/Biotechnology International trends and perspectives*, Paris, Organisation de coopèration et de développement économiques.

încercau, de asemenea, să prezinte consecințele evoluției biotehnologiilor și aplicațiilor lor. Iată cîteva exemple: rapoartele elaborate în Marea Britanie de comun acord cu Advisory Council for Applied Research and Development, Advisory Board for the Research Councils și Royal Society (martie, 1980); în Franța, raportul elaborat de către Gros, Jacob și Royer asupra *Științelor vieții și societății* (1979); în R.F.G. raportul Asociației de echipare chimică (DECHEMA), *Biotechnologie*: *Eine Studie über Forschung und Entwicklung — Möglichkeiten, Aufgaben und Schwerpunkte der Förderung* (martie 1976); raportul Comisiei comunităților europene semnat de Rörsch (Universitatea din Leiden, Olanda) asupra manipulărilor genetice de biologie aplicată (1978), și de Thomas (Universitatea Tehnologică din Compiègne, Franța), asupra producerii de biocatalizatori, fixarea și exploatarea lor (1978).

Firmele naționale sau multinaționale implicate în dezvoltarea bioindustriei nu își ascund ambițiile. Adesea cotate la Bursă, susținute de importante grupuri financiare, angajate într-o competiție în care imperativele comerciale și științifice sînt strîns legate, aceste societăți speră să cîștige mulți bani, cu riscul de a continua, în pierdere timp de cîțiva ani, cercetări în vederea descoperirii sușelor și procedeelor susceptibile de a da cele mai bune rezultate în domeniul industrial. Piețele posibile ale bioindustriei reprezintă, într-adevăr miliarde de dolari (tabelul 12), ceea ce explică competiția între laboratoare, goana după brevete și secretul care învăluie aceste cercetări. La nivelul statelor, există o importantă preocupare de a nu mări dependența tehnologică, ca în alte domenii, cum ar fi informația și noile tehnici de comunicare a informației.

Tabelul 12. **Evaluarea pieței bioindustriei în Franța și în lume, în 1980 și 1990, în miliarde de franci 1980 (după Barlet, 1981)**

Sector și tipuri de produse	1980		1990	
	în Franța	în lume	în Franța	în lume
Industria farmaceutică				
Antibiotice	1,5	27,5	2,2	40,7
Interferon	0	0	0,3	3
Vaccinuri, produse obținute din sînge și reactivi de diagnostic	1,16	11	2,22	21,26
Hormoni	0,48	4,8	0,61	6,1
Vitamine	0,15	1,3	0,19	1,81
Alte produse	0,3	3	0,33	3,3
Subtotal	3,6	47	5,8	76
Industria agroalimentară				
Produse din porumb	1,53	33,6	1,89	42,8
Aminoacizi	0,17	4,6	0,28	7,5
Acizi organici	0,13	3,4	0,17	4,59
Enzime	0,1	0,9	0,1	1,3
Subtotal	1,9	43	2,4	56
Agricultură				
Semințe	3,5	40	5,2	53,7
Alte produse	0,02	0,2	0,03	0,3
Subtotal	3,5	40	5	54
Industria chimică				
Etanol	0	7	(2)[a]	50
Alte produse	0	0	—	10
Subtotal	0	7	(2)[a]	60
Total	9	137	13 (15)[a]	246

[a] Ipoteza unui program francez de producere a alcoolului-carburant. 1 dolar ≈ 5 franci.

Tendințe actuale ale dezvoltării bioindustriei

Japonia

Japonia, ca și alte țări asiatice, posedă o foarte veche tradiție în materie de fabricare a băuturilor și alimentelor fermentate, pornind de la orez și soia. La începutul perioadei Meiji (1868—1912), studiul proceselor de fermentație în vederea perfecționării lor a fost unul dintre primele obiective ale cercetărilor științifice și tehnice. Guvernul imperial avea, pe de altă parte, interesul să-i ajute pe producătorii de vin de orez (saké) pentru ameliorarea tehnicii de fermentare folosite de ei, deoarece vînzarea saké-ului îi aducea venituri însemnate (Gregory, 1982). Studiul produșilor metabolismului ființelor vii și în special al microorganismelor a devenit o ramură importantă a chimiei agricole încă de la începutul perioadei Meiji. Dezvoltarea microbiologiei industriale urma să se sprijine pe o puternică tradiție de studiu și cercetare de biochimie microbiană.

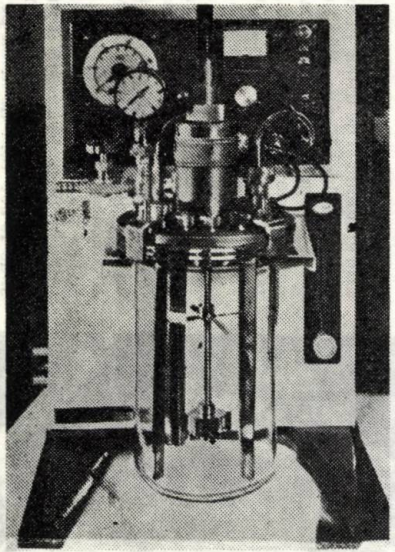
După cel de-al doilea război mondial, microbiologia aplicată a devenit treptat unul din principalele domenii ale cercetării științifice și tehnologice din Japonia. În 1953 a fost creat, la Universitatea din Tokio, Institutul de Microbiologie Aplicată, care urma să joace un rol foarte important în acest sector al cercetării.

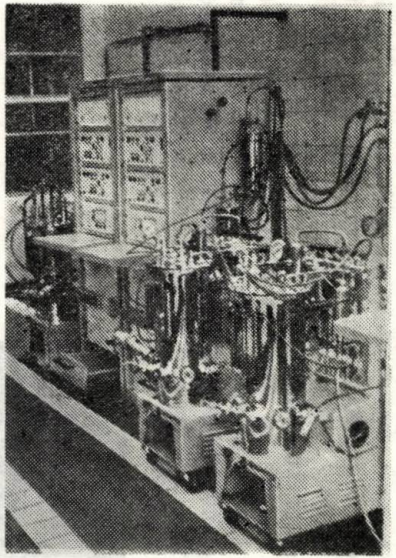
Actualul avînt al biotehnologiilor izvora din progresul spectaculos al cunoștințelor de biologie moleculară și celulară, de biochimie și de genetică, dar se explica, de asemenea, după creșterea însemnată a prețurilor petrolului din 1973, prin preocuparea de a găsi pentru industriile japoneze alte materii prime decît cele de natură petrochimică, de a păstra avansul tehnologic și de a răspunde nevoilor, în materie de sănătate, ale unei populații caracterizate prin creșterea proporției persoanelor vîrstnice.

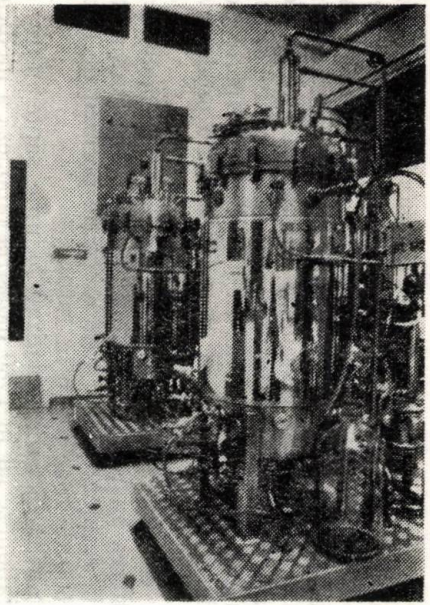
Utilizarea microorganismelor în scopuri industriale nu este nouă în Japonia, dar microbiologia industrială a fost clasată ca o ramură distinctă. MITI definea biotehnologia ca utilizarea organismelor, a sistemelor și proceselor biologice în industriile manufacturiere: bacterii, drojdii, ciuperci și alge, celule și țesuturi vegetale și de animale superioare, sau enzime extrase din toate aceste organisme, furnizează ingredientele unor noi industrii și contribuie la înlocuirea procedeelor chimice și mecanice actuale de către altele, noi și perfecționate, ale microbiologiei industriale. Biotehnologiile aveau așadar, ca și microelectronica, un impact asupra a numeroase activități industriale.

Producțiile de saké (27 de milioane de hectolitri pe an în 1980), de pastă din boabe de soia fermentate (miso, 700 000 de tone pe an în 1980) și de sos de soia (shoyu, 12 milioane de hectolitri pe an în 1980) se bazau pe procedee tradiționale care fuseseră perfecționate și industrializate pentru a face să crească în mod considerabil randamentul și să se poată face față creșterii cererii. Acestor procedee tradiționale și alte procese de fermentație li s-au adăugat iar dezvoltarea lor a fost însoțită de exportul de produse în țările asiatice: bere (50 de milioane de hectolitri pe an în 1980), vin, oțet (3 milioane de hectolitri în 1980).

Japonia deținea practic toate licențele de fabricare a 20 de aminoacizi, fabricați cel mai adesea prin fermentare (85 000 de tone pe an în 1980, cu excep-







Fermentatoare de 6, de 15 și de 200 de litri.

Fermentatoarele sînt recipiente în care se desfășoară fermentațiile microbiene și în care, în general, se cultivă microorganisme în scopul producerii industriale a diverselor substanțe sau pentru teste în laborator. Controlul compoziției mediului de cultură și al diverșilor parametri fizico-chimici care caracterizează acest mediu în timpul creșterii microorganismelor, precum și ameliorarea randamentelor necesită instalații din ce în ce mai complexe.

[Foto: Interscience, Franța — fermentatorul de 6 l.]

[Foto: Biolafitte, Franța — fermentatoarele de 15 și 200 l.

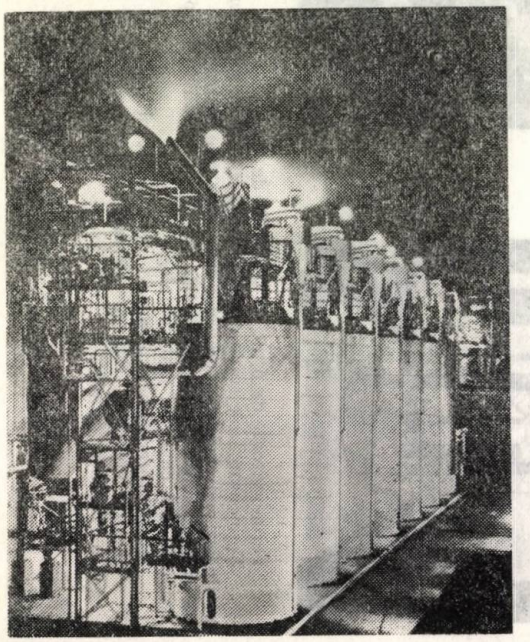
În: Biofutur (Paris), nr. 5, 1982, p. 70.]

ția acidului glutamic). Originea acestei industrii a fost descoperirea făcută de Ikeda, în 1908, a principiului activ al unui condiment tradițional, preparat pornind de la o algă brună (kombu), care era glutamatul de sodiu. Acesta din urmă (ajinomoto) a fost fabricat mai întîi prin hidroliza chimică a glutenului, dar, în 1956, Kinoshita a utilizat sușe de *Corynebacterium* pentru a produce acidul glutamic. Cercetările efectuate de atunci, atît în domeniul selecției și izolării celor mai performante sușe bacteriene, cît și în domeniul perfecționării tehnicilor de fermentație, au dus la sporiri spectaculoase ale productivității și au situat Japonia în fruntea ierarhiei mondiale.

Unele nucleotide, ca inozin-monofosfatul și guanozin-monofosfatul, utilizate pentru evidențierea gustului alimentelor (asociate cu glutamatul de sodiu), erau produse prin fermentare sau prin extracție pornind de la acidul ribonucleic al drojdiei (600 de tone pe an în 1980).

În 1979, din 11 noi antibiotice comercializate în lume, șapte au fost sintetizate de laboratoarele japoneze iar în 1980 industria japoneză a medicamentelor era pe locul doi după cea aparținînd S.U.A. Producția, foarte diversificată, cuprindea produse folosite pe scară largă (penicilinele G și V, cefalosporina C, streptomicina etc.) antibiotice hemisintetice din generația a 2-a și a 3-a, substanțe antitumorale și imunomodulatori. Vreo douăzeci de societăți erau angajate în acest sector cu dezvoltare rapidă, cercetările fiind orientate către descoperirea de noi molecule, naturale sau hemisintetice, în special în lupta împotriva cancerului. Pe de altă parte, din zece mari producătoare mondiale de interferon, cinci erau japoneze.

În 1965, Sato și Tsumura au observat că streptomicetele produceau o glucoz-izomerază și, în 1966, Takasaki a brevetat un procedeu care utiliza celulele de streptomicete într-o serie de reacții conducînd la producerea unui amestec de glucoză și fructoză pornind de la amidon (Crott, în Salomon,



Unități de producere industrială de acid glutamic și de lizină în uzina firmei Kyowa Hakko Kogyo din Japonia.

Fotografia reprezintă șapte din cele douăzeci de unități de producere industrială ale uzinei firmei japoneze Kyowa Hakko Kogyo, din Hofu (Japonia), specializată în producerea de aminoacizi. Aceste unități au fost construite la începutul anilor 70 și sînt cele mai mari din această uzină: înalte de aproape 30 m au un volum de aproximativ 240 000 l. Producerea de acid glutamic și de lizină se face printr-un procedeu aerob. Cantitățile produse de această firmă japoneză erau de 20 000 tone de glutamat de sodiu și de 10 000 tone de lizină pe an în 1980.

1982). În 1969, compania Tanabe Seiyaku a realizat prima aplicare a enzimelor imobilizate, utilizînd aminoacilaza fixată pe o coloană de DEAE-Sephadex pentru producerea continuă de L-aminoacizi pornind de la acyl-DL-aminoacizi ceea ce reducerea cu 40% costul de producție față de procedeul clasic utilizînd enzima liberă. Aplicațiile enzimelor imobilizate s-au extins și la producerea de siropuri de fructoză, la hidroliza rafinozei, cu ajutorul melibiazei și la bioconversia antibioticelor.

În 1980, cinci firme utilizau tehnici analoage, conținînd enzime imobilizate (aminoacilaza, aspartaza, glucoz-izomeraza, fumaraza și penicilin-acilaza) și celule imobilizate (*Escherichia coli* pentru aspartază, *Brevibacterium ammoniagenes* pentru fumarază și *Streptomyces* sp. pentru glucoz-izomerază). Compania Tanabe Seiyaku a elaborat tehnici care utilizează celulele imobilizate de *Pseudomonas putida* (L-arginin-deiminaza), de *Achromonobacter liquidum* (L-histidin-amonialiaza) și de *E. coli* (penicilin-amidaza) (Newmark, 1980). Pe de altă parte, cercetări intense aveau ca obiect izolarea de enzime termostabile și acidorezistente, în scopul utilizării lor în industria chimică și petrochimică.

În Japonia, inovarea în cadrul biotehnologiilor venea din partea marilor companii implicate în industria alimentară, chimică și farmaceutică, în timp ce în S.U.A. acest rol motor era jucat de noi întreprinderi. 70 de companii importante făceau parte din Consiliul de Științe ale Vieții din cadrul Federației Japoneze a Organismelor Economice (Keidanren) și 50 dintre ele aparțineau unor sectoare înrudite cu biotehnologiile. Conform unei anchete realizate de ziarul Nihon Keizai Shimbun, cel puțin 96 de companii au elaborat planuri de comercializare a unor produse de origine microbiană între 1983 și 1987; produsele farmaceutice reprezentau 44% din aceste produse noi, mărfurile alimentare și compușii chimici — 23%, astfel încît se prevedea că, în cursul actualului deceniu, 10% din toate produsele chimice industriale vor fi produse de microorganisme și că spre sfîrșitul anilor '90, 30% din procedeele de natură petrochimică și care consumă multă energie vor fi înlocuite de tehnicile microbiologiei industriale (Gregory, 1982).

În 1975, Ministerul Industriei și Comerțului Exterior (MITI) a hotărît să acorde prioritate microbiologiei și a alocat, din 1975 pînă în 1980, șase miliarde de yeni unui număr de aproape 200 de proiecte de cercetare. În 1981, MITI a inclus biotehnologiile ca pe unul din domeniile de cercetare esențiale într-un nou program asupra tehnologiilor industriale, care avea ca obiect dezvoltarea cunoștințelor științifice și industriale indispensabile Japoniei în anii '90. O asociație pentru dezvoltarea biotehnologiilor a fost creată în cadrul acestui program în august 1981 și cele 14 mari companii angajate în industria alimentară, chimică și farmaceutică din care era formată, urmau să consacre 26 de miliarde de yeni, între 1982 și 1990, cercetărilor asupra biotehnologiilor (Gregory, 1982). Firma Kyowa Hakko Kogyo, care era foarte avansată în domeniul tehnologiei fermentațiilor, a fost desemnată de MITI pentru a coordona, începînd din septembrie 1981, cercetările efectuate de un grup de firme industriale asupra culturii pe scară largă a celulelor animale.

În afară de MITI, alte cinci instituții guvernamentale interveneau în promovarea biotehnologiilor. În 1979, Agenția pentru Știință și Tehnologie, care a fost creată în 1973, a lansat un program de cercetare de patru ani în domeniul enzimologiei, geneticii și asupra ADN-recombinat, al cărui buget era de 1,5 miliarde de yeni pe an. Consiliul științei acorda și el sprijinul său cercetărilor întreprinse în aceste domenii în aproape 100 de universități.

Ministerul sănătății și bunăstării a adoptat, la rîndul său, un program care viza încurajarea, începînd din 1982, a noilor tehnologii de producere a hormonilor, interferonilor, vaccinurilor, vitaminelor, aminoacizilor, antibioticelor și reactivilor de diagnostic. În sfîrșit, lucrările Institutului Național de Genetică, din Mishima, care face parte din Ministerul Agriculturii, Silviculturii și Pescuitului, aveau ca obiect transferul genelor fixatoare de azot ale bacteriilor diazotrofe, la plantele cultivate.

Valoarea produselor microbiologiei industriale în Japonia ar fi, după părerea lui Gregory (1982), de cel puțin 11—12 trilioane de yeni sau de aproape 50 de miliarde de dolari, adică aproape 5% din produsul național brut. Cu titlu comparativ, valoarea echipamentelor electrice (conținînd și echipamentele grele și materialele electronice) produse de Japonia era de 12,6 trilioane de yeni.

Statele Unite ale Americii

Statele Unite se situau pe locul al doilea, după Japonia, în domeniul biotehnologiilor, dacă s-ar lua în considerare producția și numărul de brevete obținute. Industria farmaceutică americană este totuși, în domeniul antibioticelor (care reprezentau aproape 12% din producția formaceutică, prima din lume în ce privește producerea și vînzările de licențe. Cu toate acestea, companiile japoneze păreau mai avansate în materie de cercetare asupra cefalosporinei și de producere a acestei categorii de antibiotice.

Evoluția producției de izoglucoză începînd din 1974 arăta cît de rapidă putea fi dezvoltarea biotehnologiilor atunci cînd există tehnologia și piața de desfacere și cînd nu intervine nici o limitare artificială (fig. 18).

Izoglucoza (sau siropul de fructoză de porumb—high fructose corn syrup, HFCS) este un amestec de glucoză și de fructoză obținut prin izomerizarea glucozei pornind de la hidroliza amidonului de porumb; aceste soluții seamănă cu cele de zahăr invertit (amestec lichid de glucoză și de fructoză, obținut prin hidroliza zaharozei cu ajutorul enzimelor sau acizilor) dar ele nu conțin zaharoză. Fructoza are o putere de îndulcire superioară celei a zaharozei și a glucozei, și este utilizată în regimurile diabeticilor. Prepararea sa în stare pură este dificilă și se face pornind de la zahărul invertit separînd fructoza de glucoză. În 1967, Clinton Corn Processing Company (CPC), creată în Statul Iowa, a comercializat primul sirop de izoglucoză, numit Izomeraza 30, deoarece conținea 30% fructoză. Un an mai tîrziu era comercializat un alt sirop a

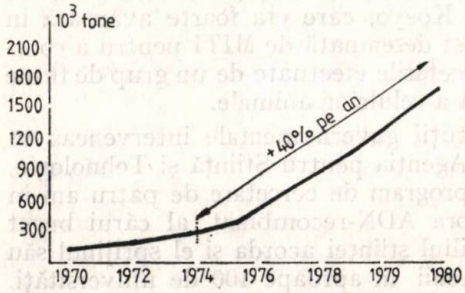


Fig. 18. Evoluția producției de izoclucoză în S.U.A. între 1970 și 1980 (în mii de tone de substanță uscată).

cărui concentrație de fructoză era de 42%, în timp ce în 1972 un procedeu de producere continuă a izoglucozei era elaborat cu utilizarea de izomerază imobilizată pe rășini (producția anuală a CPC era de ordinul a 0,5 milioane de tone de siropuri de fructoză). În 1976 au fost produse siropurile cu 55 și 90% fructoză care urmau treptat să înlocuiască soluțiile de zahăr invertit în întrebuințările lui industriale și clinice (Crott, în Salomon, 1982). Cercetările actuale au ca obiect selectarea sușelor bacteriene mai performante, sistemele enzimatice multiple imobilizate, precum și automatizarea ansamblului procedeului de fabricare (v. pag. 159).

În sectorul tehnologiei enzimatice, în afara producerii foarte răspîndite a siropurilor de fructoză, programul elaborat de National Science Foundation asupra cercetării aplicate nevoilor naționale (Research Applied to National Needs Programme) urma să sporească numărul și varietatea aplicațiilor. Celulele imobilizate ale mai multor specii microbiene au fost utilizate pentru producerea a diverse substanțe: *Streptomyces venezuelae* și *Bacillus* sp. (fructoză), *Saccharomyces cerevisiae* (zaharoză), *E. coli* (acid fumaric), *Nocardia erythropolis* (Δ^4 — colesteron), *Corynebacterium simplex* (prednisolon), *Serratia marcescens* (acid 2-cetogluconic) și *Corynebacterium lilium* (acid glutamic) [Newmark, 1980].

Începînd din 1978, guvernul federal american a sprijinit cercetările din diversele domenii ale biotehnologiilor și mai ales în cel al recombinărilor genetice: 365 de contracte de cercetare, însumînd 42 de milioane de dolari, au fost acordate de către National Institutes of Health. Cercetările fundamentale s-au desfășurat în 29 de universități, cu trei poli regionali la Harvard, Stanford și în regiunea Marilor Lacuri (Universitatea din Wisconsin). Între 1975 și 1980, peste 266 milioane de dolari au fost investiți în aproape 25 de societăți de inginerie genetică însărcinate cu valorificarea rezultatelor cercetărilor universitare și cu obținerea brevetelor. Conform declarației firmei Eberstadt and Co., din New York, și studiului efectuat de Technology Assessment Office, numărul întreprinderilor de inginerie genetică nu depășea cifra 14 la sfîrșitul lui 1979. Lista publicată de acestă firmă și datată 20 ianuarie 1982 cuprindea 45 de companii (tabelul 13).

Tabelul 13. **Principalele companii americane de biotehnologie și de inginerie genetică (anul înființării)**

Agrigenetics (1976)	DNAX Ltd (1981)
Amgene (1981)	Enzo Biochem (1976)
Bethesda Research Laboratories (1975)	Genentech (1976)
Biogen (1978)	Genetics Institute (1981)
Biologicals (1980)	Genetics Replication Technologies
Bio-response (1980)	Inc. (1981)
Bio-tech general (1980)	Genex (1979)
Calgene Inc. (1981)	Hybritech (1978)
Centocor (1979)	Kappa Scientific Col (1979)
Centaur Genetics Corp. (1981)	Monoclonal Antibodies Inc. (1979)
Cetus (1971)	Molecular genetics (1979)
Cetus Immune Corporation (1981)	Neo Bionics (1980)
Clonal Research (1979)	New England Bio Labs (1980)
Collaborative Genetics (1979)	Phytogen (1981)
Cytogen (1980)	Transgene (1980)
Damon Biotech (1981)	Unigene (1981)
DNA Science Inc. (1981)	University Genetics (1981)

În majoritatea cazurilor, crearea acestor societăți a fost realizată, într-o primă etapă, pornind de la asociația dintre unul sau doi cercetători cu un specialist al finanțării de operațiuni noi — the venture capital. Primii aduceau proiectele și competența lor, celălalt fondurile indispensabile și capacitatea de gestiune. Într-o a doua etapă, grupuri industriale participau la capitalul întreprinderii, apoi alți investitori erau admiși pe rînd după plata unor taxe, de fiecare dată mai ridicate. În sfîrșit, acțiunile acestor societăți erau introduse la Bursă: în cazul societății Genentech după patru ani de existență și în cazul societății Cetus, după nouă ani.

Patru din aceste societăți au obținut rezultate spectaculoase în domeniul cercetărilor privind recombinarea acizilor nucleici: Cetus, Genentech, Genex și Biogen.

Cetus, cea mai veche, a fost fondată în 1971, la Berkeley, în California, de Glaser (premiul Nobel pentru fizică) și Cape, biochimist, în scopul izolării, grație tehnicilor clasice de selecție genetică, de microorganisme mai folositoare pentru industrie. Mai tîrziu, metodele bazate pe utilizarea ADN-recombinat au ocupat un loc preponderent în activitatea acestei companii, al cărui consiliu științific era condus de geneticianul J. Lederberg. În domeniul chimiei organice, Cetus s-a interesat de conversia etilenei și propilenei în oxizii și glicolii lor, cu ajutorul enzimelor și celulelor imobilizate. Utilizarea biocatalizatorilor urma să fie mai puțin costisitoare decît procedeele obținute, care necesitau temperaturi și presiuni ridicate și făceau apel la catalizatori metalici (v.p. 160). În colaborare cu Standard Oil din California, o uzină-pilot urma să fie construită pentru producerea industrială a acestor compuși. Cetus s-a ocupat, de asemenea, cu fabricarea de lubrefianți de calitate obținuți prin transformarea petrolului de către microorganisme, pentru a găsi înlocuitori ai uleiului de cașalot; aceste produse reprezentau o piață de mai multe sute de milioane de dolari. Alte lucrări aveau ca obiect substanțe asemănătoare gumei, produse prin inginerie genetică, în scopul folosirii lor în puțurile de petrol aflate la sfîrșitul exploatării pentru recuperarea maximă de petrol. De comun acord cu National Distillers, societatea Cetus avea un proiect de fermentație continuă a zaharurilor și obținerea de etanol cu ajutorul unei sușe de drojdie extrem de eficace pe care ea însăși o selecționase. Domeniul activităților acestei societăți cuprinde și sinteza de produse farmaceutice, de interferon, a factorului VIII al coagulării sanguine și de proteine monocelulare. Ea poseda un vast laborator strict izolat.

Cetus avea, în 1980, o valoare de aproape 100 de milioane de dolari, ținînd cont de tranzacțiile acțiunilor. Acestea erau deținute de fondatori și, în proporție de 61%, de către companiile Standard Oil din California, Standard Oil din Indiana și National Distillers, precum și de către 200 de mici acționari. Cetus, folosea, în 1980, 250 de persoane, dintre care 35 aveau titlul de doctori în științe.

Și Societatea Genentech se află tot în California, în golful San Francisco. A fost fondată, în 1976, de Swanson (președinte și director general) și Boyer (vicepreședinte și profesor de biochimie la Universitatea din California, San Francisco). Cu un echipament inițial estimat la un milion de dolari, Genentech a cunoscut un avînt deosebit și folosea în 1980 un număr de 70 de persoane, din care 30 doctori în științe și un număr echivalent de consultanți externi. Rezultatele spectaculoase relative la sinteza somatostatinei, a insulinei, a hormonului de creștere umană și a interferonilor

erau datorate, în mare parte, faptului că Genentech reușise să-și asigure colaborarea unor universitari eminenți și că cercetătorii erau de asemenea deținători de acțiuni ale companiei.

Wall Street Journal saluta prima zi a tranzacțiilor de bursă asupra acțiunilor companiei Genentech ca pe „unul dintre cele mai spectaculoase evenimente ale istoriei recente a pieței financiare" (Dickson, 1980 b). Compania urma, într-adevăr, să ofere 1 milion de acțiuni la un preț cuprins între 20 și 30 de dolari, dar cererea era atît de puternică încît fusese fixat un preț inițial de 35 de dolari și au fost emise 100 000 de acțiuni suplimentare, în octombrie 1980, ceea ce conferea companiei o investiție de aproape 36 de milioane de dolari. Mai tîrziu, peste jumătate din acțiuni au fost vîndute de către deținătorii lor la niște prețuri care ajungeau pînă la 80 de dolari bucata, pentru a reveni la 71 de dolari. Cum compania avea 7,5 milioane de acțiuni, valoarea ei era estimată la peste 500 de milioane de dolari (sau, mai degrabă, între 180 și 300 de milioane de dolari).

Cei doi fondatori ai companiei posedau aproape un milion de acțiuni (15%). Deținătorul principal al acestora era firma de chimie industrială din Cleveland Lubrizol Incorporated, care a cumpărat 1,5 milioane de acțiuni la prețul de 10 dolari bucata (24%); Kleiner și Perkins, societate furnizoare de capital din San Francisco, posedau aproape un milion (14%) și Wilmington Securities Inc. sub 500 000 (6,2%). Restul acțiunilor era repartizat între personalul științific și conducerea companiei.

Informațiile comunicate de companie, în august 1980, semnalau că cifra de afaceri a acesteia în perioada primului semestru a anului 1980 s-a ridicat la 3,8 milioane de dolari față de 3,4 milioane dolari, în 1979. Această cifră de afaceri era esențialmente alimentată de contractele cu Eli Lilly, compania suedeză Kabi Vitrum și Hoffmann-La Roche, în scopul producerii comerciale a insulinei, respectiv a hormonului de creștere și interferonului. Aceste contracte urmau să furnizeze cel puțin 2,7 milioane de dolari în timpul celui de-al doilea semestru din 1980.

În aprilie 1982, grupul Corning Glass (din Corning, în Statul New York) și-a anunțat participarea la capitalul societății Genentech, cumpărînd în cursul unei perioade de doi ani acțiuni în valoare de 20 de milioane de dolari (în jur de 571 000 de acțiuni la prețul de 35 de dolari acțiunea, adică 6% din capitalul societății Genentech). Această participare urma să se traducă prin crearea unei noi societăți, Genencor Inc., care avea sarcina de a elabora, a produce și a vinde enzime imobilizate pe suporturi fixe și utilizate în industria alimentară. Grupul Corning urma să transfere în cadrul noii societăți Genencor Inc. Secția Enzime (enzime industriale) pe care o cumpărase de la firma americană Rohm and Haas în 1981.

Grupul Corning Glass, ale cărei activități au cunoscut o continuă dezvoltare de la crearea lui, la sfîrșitul secolului al XIX, în industria sticlei, s-a specializat, începînd din 1965, în biotehnologii (Corning BIOsystems) producînd enzime sau microorganisme imobilizate pe microsfere de sticlă sau de ceramică poroasă. El și-a asigurat astfel un loc notabil în anumite domenii ale industriei agroalimentare și în special în cel al valorificării zerului, subprodus de la fabricarea brînzei. În decembrie 1981 a fost creată în S.U.A. firma Nutrisearch în scopul utilizării zerului în producerea de proteine și de drojdii de brutărie, iar în ianuarie 1982, în Marea Britanie, societatea Specialist Dairy Ingredient și Milk Marketing Board s-au asociat pentru

transformarea zerului. Corning Glass și Uniunea Laptelui Normandă proiectau construirea în Franța a unei unități de transformare industrială a zerului.

Compania Genex, din Rockville, lîngă Bethesda, în Statul Maryland a fost fondată în 1977 de Johnston, investitor, și Glick, biochimist. Ea cuprindea în jur de 30 de cercetători și consiliul ei științific era prezidat de D. Jackson, de la Universitatea din Michigan. Genex s-a specializat în prepararea, pe cale biochimică, de compuși metabolici intermediari. Valoarea ei a fost estimată, în 1980, la peste 10 milioane de dolari; aproximativ o treime din acțiuni era deținută de fondatori și cercetători, iar celelalte două treimi erau în mîinile companiilor industriale (ca Innoven, care deținea 25% și era o creație a firmelor Monsanto și Emerson Electric, sau Koppers care deținea 30%).

Fondatorii societății Biogen S.A. au hotărît, în 1978, să înregistreze compania în Luxemburg și să instaleze sediul social la Geneva. Inițiativa creării ei revenea lui D. Adams, de la International Nickel Company (INCO), care poseda 24% din capital, în timp ce firma farmaceutică Schering-Plough avea o participare de 16% din capital. Firmele General Metropolitan și Monsanto erau și ele printre cele care investiseră. Consiliul științific al societății Biogen S.A. cuprindea în majoritate cercetători europeni, ca Weissmann (Universitatea din Zürich), Murray (Universitatea din Edinburgh) și Hartley (Imperial College din Londra), dar și pe Gilbert (Universitatea Harvard) și Sharp (Massachusetts Institute of Technology). Salariații de la Biogen S.A. erau în număr de aproape cincizeci, iar valoarea companiei era estimată, în 1980, la 50 de milioane de dolari. În octombrie 1981, Biogen S.A. a obținut o finanțare suplimentară de 20 de milioane de dolari din partea băncilor și companiilor de asigurări, cele mai multe din Marea Britanie. Primele substanțe produse de Biogen S.A. urmau să fie comercializate în 1983. Interferonul leucocitar uman sintetizat de bacterii cu genom modificat era produs la Zürich pentru Schering-Plough, iar unele teste clinice preliminare au fost realizate în Olanda. Murray a reușit să cloneze gena proteinei învelișului exterior al virusului hepatitei B, ceea ce reprezenta o etapă importantă în producerea vaccinului împotriva acestei boli. Vaccinul astfel preparat era testat pe animale și Biogen S.A. a negociat, cu firma farmaceutică japoneză din Osaka, Green Cross Corporation, comercializarea eventuală a unui astfel de vaccin. Alte teste aveau ca obiect un vaccin contra febrei aftoase. Biogen S.A., care conta pe companii cunoscute pentru comercializarea produselor sale, intenționa ca, începînd din 1983, să adopte alte forme de organizare în această privință.

Biogen S.A. a creat, în octombrie 1981, la Cambridge, pe lîngă Massachusetts Institute of Technology, o filială, Biogen Inc., al cărui președinte era Gilbert (premiul Nobel 1980 și profesor la Universitatea Harvard). Acesta se asociase societății Biogen S.A. de la crearea ei, în 1978, deoarece ocupase funcțiile de președinte al consilului științific și copreședinte al consiliului directorilor de la mijlocul anului 1979. Grupul avea, la sfîrșitul lui 1982, aproape 75 de membri, ale căror activități aveau ca obiect diferite procedee de inginerie biochimică, și în special cele privind producerea de etanol și de alți compuși cu ajutorul bacteriilor. S-au întreprins cercetări și asupra regiunilor H-2 din genomul de șoarece, responsabile cu sinteza antigenilor de histocompatibilitate, precum și asupra regiunilor echivalente

HLA din genomul uman, probabil în scopul elaborării de reactivi de identificare a tipurilor tisulare. Cercetătorii acestei echipe, în număr de 20, erau conduși de Flavell, specialist britanic în clonarea genelor, care, la începutul anului 1982, lucra la National Institute of Medical Research din Londra (Newmark, 1981 e; Walgate, 1982).

În afară de cele patru companii citate anterior și numeroase altele din California, precum și în regiunile Boston, Bethesda și New York (v. tabelul 13), unele firme farmaceutice au ajuns să fie recunoscute pentru competența lor în materie de utilizare a tehnicilor de recombinare genetică. Eli Lilly avea programe de cercetare în domeniile fermentațiilor, agriculturii și medicinei. Pfizer și Hoffman — La Roche lucrau activ la producerea de interferon și erau în competiție în acest domeniu cu Biogen S.A., în timp ce Upjohn se interesa de ameliorarea metodelor de fermentație și de producerea de antibiotice (un cercetător al acestei companii, Frazer, a reușit introducerea în colibacil a genei ovalbuminei de pui de găină și expresia acesteia de către bacterie). Laboratoarele G.D. Searle își continuau cercetările de inginerie genetică în instalațiile lor din High Wycombe (Marea Britanie), și cercetătorii lor au reușit să sintetizeze, cu ajutorul unei bacterii, hemaglutinina virusului gripei. E. I. DuPont din Nemours a lansat, în 1979, un program de cercetări cuprinzînd lucrări de recombinare genetică și, în 1980, o echipă de 10 doctori în știință a acestei mari companii de produse chimice se interesa de fabricarea de substanțe farmaceutice, de proteine și de alți compuși organici.

Cele patru companii de inginerie genetică Cetus, Genentech, Genex și Biogen reprezentau, în 1980, o valoare globală de peste 400 de milioane de dolari, ceea ce dovedea, celor care investiseră în ele, importanța mizei comerciale și industriale a lucrărilor lor. Viitorul și succesul acestora din urmă depindeau atît de fabricarea pe scară largă și de comercializarea produselor manufacturate, cît și de vînzarea de brevete pentru acestea din urmă. Concurența între ele era cu atît mai vie cu cît recomandările referitoare la cercetările privind recombinările genetice și publicate de National Institutes of Health (NIH) deveneau mai puțin restrictive. În 1980, cele aproape 30 de laboratoare care, în S.U.A., efectuau cercetări în acest domeniu, au prezentat 170 de experiențe Institutului Național al Sănătății din S.U.A. Recomandările NIH reduceau clar exigențele de securitate pentru aproape 80% din ansamblul cercetărilor de inginerie genetică, și, din aceste 80%, 50% din lucrări se aflau în categoria de „minimă securitate", care nu mai era sub controlul NIH. Mai multe companii se conformau reglementărilor guvernului federal, care se aplicau cercetărilor finanțate de acesta din urmă; unele dintre ele, ca Eli Lilly și Genentech, au reușit să obțină autorizația NIH de a produce insulina și somatostatina în bioreactoare de mare volum (150 și respectiv 750 de litri) [v. p. 263].

Pe de altă parte, dezvoltarea firmelor interesate de biotehnologii a evoluat din domeniul farmaceutic și medical către cel al industriei și al agriculturii. În acest din urmă caz, obiectivul era sporirea randamentelor agricole, viteza de creștere a plantelor și rezistența acestora din urmă la agenții patogeni și la factorii fizici ai mediului. Companiile Allied Chemicals, Dow Chemicals și DuPont se interesau în primul rînd de aplicarea biotehnologiilor în domeniul agricol. Firma farmaceutică Eli Lilly a dedicat 35% din bugetul ei pentru cercetare-dezvoltare inovațiilor de natură agronomică. În

august 1981, compania Monsanto a creat un laborator de biologie moleculară orientat spre cercetarea agronomică, în cadrul laboratoarelor sale centrale din St. Louis (Missouri). Tot această companie a făcut investiții importante în firmele Biogen, Genex și Genentech. Atlantic-Richfield a instalat un Institut de cercetare al celulei vegetale la Dublin, în California, în timp ce Ciba-Geigy proiecta aplicații în sectorul agricol ale cercetărilor biotehnologice făcute în domeniul farmaceutic și sprijinea la Bâle o fundație de cercetare care era consacrată unor lucrări asupra țesuturilor vegetale. O altă companie petrolieră, Occidental Oil, a devenit proprietara firmei Zoecon (din Palo Alto, California) care avea să-și dezvolte activitățile de cercetare în domeniul luptei biologice împotriva insectelor dăunătoare (Zoecon urma să fie cedată grupului elvețian Sandoz la începutul anului 1983). În total, companiile care se ocupau de aplicațiile biotehnologiilor în agricultură, în septembrie 1981, erau peste 50 (Walsh, 1981).

Pe de altă parte, primele firme biotehnologice orientau o parte din cercetările lor către agrobiologie; de exemplu, firma Cetus, care a creat, în acest scop, un laborator la Madison, în statul Wisconsin, și a încredințat conducerea lui, începînd din iulie 1981, lui Brill de la Universitatea din Wisconsin, binecunoscut pentru lucrările sale asupra fixării biologice a azotului atmosferic. Marile companii specializate în producerea de semințe selecționate cunoșteau și ele o astfel de orientare: astfel, Pioneer Hi-Bred International, care deținea o treime din piața americană a semințelor de porumb hibrid, a înființat o secție de microbiologie pe lîngă centrul său de hibridare situat aproape de Des Moines, în statul Iowa (Walsh, 1981).

Efortul de cercetare al guvernului federal rămînea relativ modest în acest domeniu: șase milioane de dolari în 1980, față de 27 de milioane de dolari rezervați cercetărilor medico-farmaceutice (guvernul japonez consacra 150 de milioane de dolari aplicațiilor cercetărilor biologice în agricultură).

Trebuie, de asemenea, remarcat faptul că unele firme s-au specializat în furnizarea de macromolecule și de reactivi indispensabili realizării experiențelor de recombinare genetică, în timp ce informația relativă la biotehnologii s-a înmulțit considerabil: *Applied genetic news*, *Bioengineering news*, *Biotechnology news*, *Genetic engineering news*, *Genetic technology news*, *Taglitt*; studii sau anchete asupra pieței realizate de firme de consultanți ca de exemplu, *Medicinal, chemical and diagnostic products: an evaluation of new technologies*, realizată de SRI International din California și care costa 20 000 de dolari, sau *Biotechnology, commercial applications for recombinant DNA technology*, aparținînd lui Robert First Inc. și Biogen, vîndută pentru 25 000 de dolari. Numărul congreselor, colocviilor și seminariilor consacrate acestui domeniu de cercetare a crescut în mod net.

Dezvoltarea noilor societăți de inginerie genetică și, în general, de biotehnologie, nu s-a produs fără dificultăți. Acestea erau ilustrate de exemplu, de hotărîrea luată în februarie 1982 de una dintre societăți, Bethesda Research Laboratories (BRL), de a-și reduce personalul de la 450 la 300 de persoane, ca urmare a problemelor financiare și de organizare. BRL a fost creată în 1976 și a cunoscut o dezvoltare rapidă, de vreme ce vînzările ei, care, în 1977, erau de 350 000 de dolari, iar în 1978 de un milion de dolari, au atins cifra de cinci milioane de dolari în 1980 și de 10 milioane de dolari în 1981. Situată în Gaithesburg (Maryland) lîngă

National Institutes of Health, care era unul dintre clienţii cei mai importanţi pentru cumpărarea de enzime de restricţie, această companie avea patru secţii, ale căror activităţi erau consacrate respectiv producerii de compuşi pentru laboratoarele de cercetare, de ustensile de laborator, cercetării genetice şi elaborării procedeelor de diagnostic molecular. Neputînd avea acces la capitaluri substanţiale, din cauza statutului ei de de companie privată, ea trebuia să conteze mai ales pe vînzarea produselor de laborator, ceea ce o făcea deosebit de vulnerabilă fluctuaţiilor pieţei. În acest caz compania a trebuit îndrumată în direcţia restructurării activităţilor ei. Concentrarea acestora se făcea în detrimentul proiectelor de cercetare de inginerie genetică, pentru a favoriza, în schimb, domenii mai puţin spectaculoase, dar mai rentabile, cum ar fi comercializarea truselor de diagnostic şi a noilor aparate destinate sintetizării oligonucleotidelor. Compania a declarat că reducerea personalului nu a afectat prea mult cadrele ei ştiinţifice (care reprezentau cam a şasea parte din salariaţi), deosebit de indispensabile în sectorul producerii enzimelor de restricţie, care adusese faima mondială a companiei.

Ca urmare a acestor concedieri (36% din efective) şi a schimbărilor intervenite în comitetul de conducere a companiei, i-a fost furnizat un prim aport financiar, la 19 ianuarie 1982, din partea firmei Eberstadt and Co. (New York) şi, în mai 1982, a primit o finanţare particulară de opt milioane de dolari.

BRL a comercializat, începînd din aprilie 1982, primul analizor de acizi nucleici controlat în întregime de calculator, care permitea reducerea la jumătate a timpilor de analiză. Din vara anului 1982 BRL mai comercializa şi un sintetizator semiautomat de oligonucleotide, care asambla oligonucleotide de 20 de unităţi (metoda cu fosfit) cu un randament de cel puţin 50 μg de oligonucleotide per sinteză.

Această firmă a reuşit, de asemenea, să izoleze, după doi ani de încercări, o suşă de *Escherichia coli* capabilă să sintetizeze prolinăîn mari cantităţi; tehnica de clonare şi de expresie a genei acestui aminoacid în celulele colibacilului putea fi aplicată şi în alte domenii tehnologice ca, de exemplu, producerea de antibiotice, recuperarea petrolului cu ajutorul microorganismelor şi selecţia de noi soiuri de plante cultivate.

Cazul firmei Southern Biotech, din Tampa (în Florida), a fost şi mai grav decît cel al firmei BRL, deoarece ea a dat faliment la 28 mai 1982, după ce eşuase în tentativa de a strînge fonduri suplimentare; datoriile ei se ridicau atunci la aproape două milioane de dolari (Norman şi Marshall, 1982). Acest faliment precum şi cel al unei alte firme biotehnologice din Boston, Applied Genetics, erau considerate de specialiştii în dezvoltarea bioindustriei ca foarte simptomatice pentru dificultăţile întîlnite de companiile de biotehnologie pe o piaţă financiară mai puţin optimistă şi unde erau din ce în ce mai greu de găsit capitalurile necesare unei dezvoltări susţinute şi înfloririi unor cercetări a căror exploatare comercială nu era imediată. Micile societăţi care nu puteau ţine pasul cu inovaţia tehnologică foarte rapidă din unele sectoare ale bioindustriei, ca, de exemplu, producerea interferonilor, erau extrem de vulnerabile.

Această companie a început să funcţioneze în 1977 vînzînd plasmă provenind din sîngele colectat de la deţinuţii plătiţi pentru aceasta. În iulie 1980, compania se asocia cu o întreprindere din Tampa, Key Energy Enter-

prises, a cărei activitate principală consta în vinderea de benzină și care urma să aducă în total 2,26 milioane de dolari pentru a permite firmei Southern Biotech să se lanseze în producerea interferonilor leucocitari, apoi a interferonilor fibroblastici și imun. În august 1981, compania a devenit o societate pe acțiuni și 550 000 de acțiuni erau puse pe piață la un preț unitar de 10 dolari, adică o capitalizare de ordinul a 5,55 milioane de dolari. Planurile de dezvoltare ale companiei erau socotite foarte ambițioase, deoarece intenția ei era să angajeze în jur de 30 de doctori în știință, să-și extindă producția de interferoni prin tehnicile clasice, să abordeze noi domenii de cercetare de inginerie genetică și să se ocupe de sinteza peptidelor și hibridomilor. Vînzarea acțiunilor i-a adus companiei o încasare de fonduri evaluată la 4,8 milioane de dolari; construirea laboratoarelor era terminată în noiembrie 1981 și echipamentul ei completat în ianuarie 1982 (Norman și Marshall, 1982).

La începutul anului 1982 au apărut dificultăți financiare, mai ales ca urmare a vînzării în pierdere a unor cantități de interferon leucocitar. Procedeul de fabricație era înrudit cu cel folosit de Laboratorul Central de Sănătate Publică din Helsinki și conducea la producerea unui amestec de interferoni α. Food and Drug Administration nu a autorizat vînzarea acestui interferon pentru că intenționa să realizeze unele teste clinice, astfel că, la sfîrșitul anului 1981, stocul de care dispunea Southern Biotech reprezenta, la prețul pieței, o valoare de 2,3 milioane de dolari. În mai 1982, în momentul falimentului companiei, acest stoc de interferon α era evaluat la 3,4 milioane de dolari, dar vînzarea unui asemenea stoc părea ipotetică din cauza producerii de interferon de origine biosintetică și de o puritate net superioară de către alte firme (Norman și Marshall, 1982).

Pe deasupra, Southern Biotech nu a reușit să producă interferoni fibroblastic și imun din cauza unei serii de probleme tehnice și a contaminării instalațiilor.

Speranța de a depăși dificultățile financiare a părăsit compania în momentul în care tratativele duse cu marea firmă chimică Monsanto pentru a obține un aport de capital de aproape trei milioane de dolari au eșuat. Monsanto elaborase o nouă tehnică de fracționare a plasmei și avea nevoie de furnizarea regulată de plasmă. Activitatea inițială a firmei Southern Biotech putea să răspundă acestor cerințe, dar proiectul de asociere nu a văzut lumina zilei (Norman și Marshall, 1982).

Ascensiunea rapidă a firmei Southern Biotech și falimentul ei total în mai puțin de un an după constituirea unei societăți pe acțiuni dovedeau climatul dificil pe plan financiar în care evoluau companiile de biotehnologie la începutul anilor '80. Situația creată la Southern Biotech nu făcea ușoară sarcina firmelor care erau în căutare de capitaluri, deoarece cei care puteau să investească aveau din ce în ce mai mult tendința să examineze, în mod foarte critic, proiectele întreprinderilor și probabilitatea realizării lor.

Mai mulți specialiști estimau într-adevăr că și alte întreprinderi urmau să fie în dificultate și că după perioada de euforie urma o fază de restructurare și de concentrare în funcție de obiective mai bine definite, precum și o gestiune comercială mai riguroasă a întreprinderilor. Un anumit număr de indicii permiteau într-adevăr să se justifice o asemenea opinie. În primul rînd, scăderea spectaculoasă a acțiunilor anumitor companii cotate la Bursă:

cele ale firmei Genentech reveniseră la 35 de dolari după ce atinseseră 80 de dolari, chiar din prima zi a scoaterii lor la vînzare; acțiunile firmei Cetus scăzuseră de la 25 la 13 dolari; în momentul în care, după 20 de ani de statut privat, societatea Collaborative Research Inc. (din Waltham, statul Massachusetts) hotărîse, în februarie 1982, să devină o societate pe acțiuni cotate la Bursă, primirea mediilor financiare a fost rezervată.

În al doilea rînd, aporturile de capitaluri indispensabile finanțării planurilor de dezvoltare nu păreau asigurate în mod automat chiar și pentru unele companii atît de solide ca Genentech. Scăderea ratei inflației și aplicarea de noi măsuri fiscale făceau, într-adevăr, mai atractive alte forme de investire a capitalurilor. După opinia lui Robert Johnson, bancher new-yorghez, președinte al consiliului de administrație și fondator al Genex și Cytogen (companie specializată în producerea de anticorpi monoclonali), aporturile de fonduri în întreprinderile biotehnologice au reprezentat aproape 1,5 miliarde de dolari în 1980 și 1981 și piața era foarte favorabilă pînă la sfîrșitul anului 1981 noilor întreprinderi care se consacrau tehnologiilor de vîrf. Dar el estima că, la sfîrșitul lui 1983, 50 din 150 de companii trebuiau să dispară, mai ales ca urmare a falimentelor. În ceea ce privește noile companii care urmau să fie create — Johnson lua în considerare această eventualitate din cauza presiunii în favoarea inovației tehnologice — ele aveau să se bazeze pe o concepție mai bună asupra rolului și activităților lor. Ele vor trebui, într-adevăr, să-și concentreze eforturile asupra unor piețe de desfacere restrînse, dar cu extindere rapidă, astfel încît să evite concurența cu marile companii de produse chimice; ele trebuie să ocupe 70—80% din vînzarea într-un domeniu particular, pentru a fi în măsură să-și exercite influența asupra prețurilor practicate. Produsele comercializate trebuie să fie foarte specifice, brevetabile și ușor de vîndut; în felul acesta s-ar realiza îndepărtarea de piețele deja saturate de produse ca interferonul. Biogen S.A., care a investit mulți bani și mult efort în producerea de interferon, a știut în plus să-și diversifice activitățile într-o duzină de proiecte pentru a ocupa anumite goluri din sinteza substanțelor medicamentoase (truse de diagnostic, insulină umană și vaccin antihepatita B, de exemplu) și a produselor veterinare (vaccin contra febrei aftoase) și din transformarea biomasei și deșeurilor agricole în materii prime pentru industria chimică (de exemplu, etanolul).

În al treilea rînd, promisiunile oferite celor care doreau să investească fonduri în companiile de inginerie genetică se sprijineau pe evaluări în vădit contrast cu posibilitățile actuale și viitoare ale pieței biotehnologiilor. Nu era, așadar, deloc ușor de a atrage capitalurile în asemenea condiții. Conform raportului OTA (Office of Technology Assessment), publicat în 1981 și intitulat *Impact of applied genetics, microorganisms, plants and animals*, piața totală a tuturor produselor industriale susceptibile de a beneficia de studii de inginerie genetică era evaluată la 14,6 miliarde de dolari în 1995, în timp ce, pentru T.A. Sheets Company, din Cleveland, piața mondială a produselor biotehnologice reprezenta aproape 25 de milioane de dolari în 1982 și va fi de 64,8 miliarde de dolari în anul 2000; pentru *Business Communications Company Inc.* (BCC), din Stamford (Connecticut), valoarea actuală ar fi de 60 de milioane de dolari și, în 1990, ea ar atinge 13 miliarde de dolari; previziunea făcută de IMSWORLD pentru această din urmă dată era de 27 de miliarde de dolari; în fine, *Information Services*, din Londra, estimau piața mondială la numai 10 milioane de dolari și la 500 de milioane de dolari în

1990, adică doar 2% din suma totală avansată de IMSWORLD pentru piața americană.

În sfîrșit, chiar dacă cifrele de afaceri ale companiilor de inginerie genetică erau importante, beneficiile reale rămîneau relativ scăzute și sporirea lor substanțială nu avea să se realizeze decît după cîțiva ani. Astfel, președintele companiei Cetus declara, la sfîrșitul lunii martie, 1980, că trebuia să se investească într-o firmă ca a sa 50 de milioane de dolari în cinci ani pentru a se spera realizarea unor profituri substanțiale la capătul a zece ani. Genentech în ceea ce o privea, a anunțat, la sfîrșitul lunii februarie 1982, că beneficiile anului 1981 atinseseră numai 300 000 de dolari la o cifră de afaceri de mai multe milioane de dolari. Un optimism rezonabil era în totalitate de rigoare, de vreme ce revista *Business week, international edition* (1 iunie, 1981) estima că biotehnologiile urmau să cunoască în S.U.A. o puternică creștere în ceea ce privește cifra lor de afaceri, în cursul deceniului 1980—1990, pentru același motiv ca și robotica, calculatoarele individuale și semiconductorii.

U.R.S.S.

În U.R.S.S., cercetările din diferitele domenii ale biologiei au cunoscut o dezvoltare însemnată de la începutul anilor '60. Pe plan instituțional, Institutul de Biologie Moleculară și Institutul de Chimie Bioorganică M. — Semiakin, create în 1959, Centrul de cercetări biologice al Academiei de Științe a U.R.S.S. de la Pușkin—pe—Oka (la vreo sută de kilometri sud de Moscova), instituțiile nou create în Urali, în Siberia, în cadrul academiilor de știință ale republicilor și la Kazan, la Mahacikala și la Murmansk au jucat un rol important în intensificarea activităților de cercetare (Ovcinnikov, 1982). Ca urmare a inițiativelor luate de Academia de Științe a U.R.S.S., microbiologia industrială s-a dezvoltat, de asemenea, după cum o dovedea producția de proteine de organisme monocelulare, de vitamine și de alte substanțe de origine microbiană.

Dezvoltarea biologiei și geneticii moleculare precum și a aplicațiilor lor în agricultură, în medicină și în industrie a beneficiat de resurse umane și financiare însemnate pe baza măsurilor luate la 21 mai 1974. Studiile de recombinare genetică aveau ca obiect mai ales biosinteza de hormoni (insulină), de interferon și de anticorpi monoclonali. Importanța biotehnologiilor a fost subliniată în „Principalele tendințe ale dezvoltării economice și sociale a U.R.S.S. pentru anii 1981—1985 și pînă în 1990", care au fost aprobate de cel de al 26-lea congres al Partidului (Ovcinnikov, 1982).

În iulie 1981, Comitetul Central și Consiliul de Miniștri ale U.R.S.S. au trasat sarcini Academiei de Științe, Comitetului de Stat pentru Știință și Tehnologie, Gosplan-ului și guvernelor republicilor Uniunii Sovietice de a lua hotărîrile necesare pentru a trece la aplicarea biotehnologiilor în domeniile agricol, industrial și medical, în timp ce lucrările de cercetare fundamentală din cadrul academiei și ministerelor tehnice aveau să se dezvolte în continuare (Rich, 1981). În această privință, s-ar cuveni să semnalăm cercetările intense asupra fixării biologice a azotului atmosferic și în special pe cele relative la transferul genelor microbilor diazotrofi la alte microorganisme și plante, cercetări care sînt întreprinse în mai multe institute și în laboratoa-

rele Centrului de la Puşkin-pe-Oka. La Institutul de fiziologie vegetală K.-Timiriazev, care depinde de Academia de Ştiinţe a U.R.S.S., precum şi în întreprinderile din Glavmikrobioprom, culturile de celule şi ţesuturi de ginseng şi de alte specii de plante medicinale erau destinate să sporească producţia diverselor substanţe active din punct de vedere biologic; aplicaţiile acestor tehnici de cultură se refereau de asemenea şi la plante care prezentau importanţă în plan agricol (Ovcinnikov, 1982).

Europa Occidentală

În 1981, Europa Occidentală număra aproape 200 de echipe şi peste o mie de proiecte de cercetare din domeniul recombinărilor genetice. Aproape 170 de companii se interesau, într-o măsură mai mare sau mai mică, de biotehnologii; numai 20 lucrau în domenii de vîrf, ca de exemplu recombinările genetice, folosirea enzimelor imobilizate şi culturile de celule.

R.F.G. are o îndelungată tradiţie în domeniul fermentaţiilor (fabricarea vinului şi a berii; fermentaţia acetono-butanolică), dar, la începutul anilor '70, un sprijin foarte însemnat din partea guvernului avea să dea un impuls decisiv dezvoltării biotehnologiilor. Programul „Biotehnologie", elaborat în 1974 şi mereu reînnoit de atunci, avea ca obiective: asigurarea acoperirii necesităţilor alimentare, reducerea pagubelor aduse mediului înconjurător (lupta împotriva poluării), ameliorarea diagnosticelor şi terapiei medicale, asigurarea unei mai bune aprovizionări ca materii prime, dezvoltarea tehnicilor şi avansarea cunoştinţelor de biotehnologie (Newmark, 1980).

Societatea Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF), fondată pe la mijlocul anilor '60 de Fundaţia Volkswagen, apoi preluată de guvern, este o instituţie publică de cercetare fundamentală şi de dezvoltare a tehnologiilor, care încearcă să asigure legătura între cercetare şi industrie. Stabilită la Braunschweig, lîngă Hanovra, ea cuprindea, la sfîrşitul anului 1980, 79 de oameni de ştiinţă, 101 tehnicieni şi 23 de cercetători doctori. Studiile asupra recombinărilor genetice şi asupra bioreactoarelor erau privite cu o atenţie deosebită de către GBF, în timp ce cercetări asupra degradării celulozei şi ligninei de către microorganisme, precum şi asupra metanogenezei, erau realizate la centrul de cercetări din Jülich, lîngă centrul de cercetări atomice (KFA).

Din 1974 pînă în 1981, aproximativ 267 de milioane de mărci au fost investite pentru finanţarea programului de biotehnologie, adică de zece ori mai mult decît în Franţa sau în Marea Britanie.

Subvenţiile guvernamentale, care erau de 65,9 milioane de mărci în 1982, aveau să înregistreze o creştere sensibilă. Cercetările de microbiologie, cărora le reveneau 40% din aceste credite, rămîneau prioritare şi priveau în primul rînd tehnicile de cultură de celule, crearea de colecţii de suşe, recombinările genetice.

În Marea Britanie, alocarea, la sfîrşitul anilor '60, a circa 500 000 de lire sterline pentru cercetările din domeniul tehnologiei enzimatice a avut drept consecinţă dezvoltarea tehnologiilor industriale bazate pe folosirea enzime-

lor imobilizate, în fruntea cărora se afla producerea de fructoză şi dezacilarea benzil-penicilinei.

Era de preferat utilizarea celulelor imobilizate cînd unii cofactori erau indispensabili în reacţiile de sinteză. Cercetătorii de la University College, din Londra, considerau că bioindustria trebuia să se orienteze către fabricarea de produse de mare importanţă, la adăpost de variaţiile pieţei (în felul acesta, de exemplu, fermentaţia industrială a zahărului pentru a obţine alcool era condiţionată de preţurile zahărului şi producţia proteinelor monocelulare era afectată de preţurile soiei).

Lucrările de recombinare genetică, mai ales clonarea genelor, erau efectuate la National Institute of Medical Research (NIMR), la Mill Hill, lîngă Londra, precum şi în alte laboratoare ale Consiliului de Cercetare Medicală, în special la Hills Road, Cambridge. Cercetătorii din Mill Hill studiau pe lîngă regiunile H-2 ale genomului de şoarece, responsabile de sinteza antigenilor de histocompatibilitate, şi genele globinei.

În martie 1980, raportul Spinks (Dr. Alfred Spinks prezida comitetul tripartit asupra biotehnologiei — Advisory Council for Applied Research and Development, Advisory Board for the Research Councils şi Royal Society) recomanda consiliilor de cercetare din Marea Britanie să sporească creditele consacrate biotehnologiei, care trebuiau să atingă cel puţin şase milioane de dolari pe an, în timp ce departamentele ministeriale trebuiau să aloce în jur de cinci milioane de dolari pe an. Oficiul întreprinderilor industriale din Marea Britanie (National Enterprise Board) şi National Research Development Corporation urmau să creeze o societate de cercetare biotehnologică investind în ea patru milioane de dolari pe an, timp de cinci ani. Raportul Spinks recomanda, de asemenea, dezvoltarea de centre de perfecţionare în biotehnologii la universităţile britanice şi formarea unui personal calificat (cel puţin douăzeci de noi posturi de învăţămînt şi cercetare urmau să fie create în următorii cinci ani, şi o investiţie de patru milioane de dolari avea să fie consacrată echipării laboratoarelor) (Walgate, 1980 b).

Hotărîrea de a crea o nouă societate pentru a promova biotehnologia a fost luată pe la mijlocul anului 1980, iniţiator fiind National Enterprise Board, care aveau să furnizeze 44% din capitalul iniţial de 12 milioane de lire sterline. Compania Celltech Ltd a fost instalată la sfîrşitul anului 1981 la Slough, la 30 de km vest de Londra şi cuprindea în martie 1982 un număr de 78 de persoane, dintre care 26 doctori în ştiinţe. Programul de recrutare a personalului prevedea, în septembrie 1983 un total de 150 de persoane dintre care 75 de cercetători. Acţionarii societăţii erau, în afară de Oficiul de Întreprinderi Industriale, Prudential Assurance Company, Midland Bank, British and Commonwealth Shipping şi Technical Development Capital. Lucrările societăţii aveau ca obiect realizarea de hibridomi şi fabricarea de anticorpi monoclonali pentru diagnostic, precum şi biosinteza de enzime industriale prin recombinare genetică; sinteza polinucleotidelor avea să reţină şi ea atenţia chimiştilor de la Celltech. Aceasta comercializa anticorpul monoclonal anti-interferon leucocitar.

După lucrări ce au durat douăzeci de luni, cercetătorii de la Celltech au reuşit, în 1982, să cloneze genele preprochimozinei, prochimozinei şi chimozinei, şi să obţină expresia lor în celule de *Escherichia coli*. Chimozina şi cei doi precursori ai ei sînt secretate în stomacul rugmegătoarelor tinere; enzima, care încheagă laptele, este utilizată la fabricarea brînzeturilor. Extragerea ei

din stomacuri de viţel, este insuficientă pentru a face faţă sporirii producţiei de brînzeturi (după afirmaţiile făcute de compania americană Dow Chemicals, piaţa mondială a chimozinei, varia între 70 şi 200 de milioane de dolari pe an). Biosinteza realizată de bacterii cu genom modificat ar putea, aşadar, să remedieze această situaţie.

O strînsă colaborare s-a stabilit între Celltech şi mai multe instituţii de cercetare care erau deosebit de avansate în tehnicile de recombinare genetică şi în producerea de anticorpi monoclonali de către hibridomi (Plant Breeding Research Institute, laboratoarele de la Imperial Cancer Research Fund şi Medical Research Council, ca de exemplu unitatea de imunologie celulară de la Oxford şi laboratorul de biologie moleculară de la Cambridge) (Redfearn, 1980 c, 1981).

British Technology Group şi Agricultural Research Council sperau să ajungă înainte de sfîrşitul anului 1982 la crearea unei noi societăţi, Agritech, ale cărei activităţi de cercetare urmau să aibă ca obiect aplicaţiile ingineriei genetice în agricultură. Se prevedea o finanţare de 10 milioane de dolari, provenind de la British Technology Group (1/3) şi de la societăţi particulare (2/3). Agritech avea de stabilit cu Agricultural Research Council legături de cooperare analoage cu cele dintre Celltech şi Medical Research Council.

Întreţinerea şi extinderea colecţiilor de culturi microbiene puneau Marii Britanii probleme serioase, care existau şi în alte ţări. Insuficienţa creditelor a ameninţat, într-adevăr, în 1980 şi 1981, existenţa a trei importante colecţii: cea de drojdii, cea de ciuperci şi cea de bacterii utilizate în industrie, cărora Brewery Research Foundation, Commonwealth Mycological Institute, Natural Environmental Research Council cît şi Ministerul Agriculturii, Pescuitului şi Alimentaţiei le-au retras sprijinul acordat pînă atunci. O asemenea situaţie, căreia se încerca să i se facă faţă prin expediente a determinat Federaţia colecţiilor de culturi microbiene din Marea Britanie să ceară ca de cele zece colecţii britanice să aibă grijă o singură instituţie guvernamentală. În cazul colecţiilor de culturi bacteriene utilizate în industrie, care se află la Aberdeen (Torry Research Station), Ministerul Agriculturii avea intenţia să acorde Universităţii din Aberdeen mijloacele de întreţinere a colecţiei, dar acestea din urmă erau inferioare celor 200 000 de lire sterline indispensabile pentru acoperirea cheltuielilor de întreţinere anuale. Iniţiativa înfiinţării Federaţiei Colecţiilor de Culturi Microbiene făcea parte dintr-o măsură mai generală avînd în vedere o politică naţională de conservare a resurselor genetice, cuprinzînd atît liniile de celule animale şi vegetale cît şi microbii (Redfearn, 1982 a).

În aprilie 1982, guvernul britanic a hotărît crearea unui comitet interministerial al biotehnologiei, ai cărui membrii reprezentau diferitele ministere angajate în acest domeniu precum şi consiliile cercetării medicale, agricole, ştiinţifice şi tehnologice, British Technology Group, Public Health Laboratory Service şi Centre for Applied Microbiology and Research, din Porton Down. Sarcina principală a acestui comitet era să coordoneze activităţile diferitelor părţi reprezentate. Se urmărea, de asemenea, un aspect esenţial al dezvoltării biotehnologiilor, şi anume transferul rezultatelor cercetărilor în domeniul industrial, în care se găseau deja implicate Biotechnology Directorate, creat de către Science and Engineering Research Council, şi British Technology Group, care avea ca rol exploatarea pe plan industrial a rezultatelor cercetărilor fundamentale (v.p. 249). Comitetul trebuia să promoveze,

de asemenea, cooperarea internațională în biotehnologie și să descopere mijloacele de a asigura întreținerea colecțiilor de culturi microbiene existente în Marea Britanie, prin încredințarea acestei responsabilități unui singur organism guvernamental.

Franța posedă laboratoare dotate de inginerie genetică și biologie moleculară. Situația era la fel de satisfăcătoare în ingineria biochimică (universitățile din Compiègne și din Toulouse) și, în domeniul culturilor de celule vegetale, Institutul Național de Cercetare Agronomică făcuse eforturi serioase în acest sens. În microbiologia generală, în schimb, în țara lui Pasteur se constata că această disciplină de bază și mai ales sistematica fuseseră neglijate; selecția și inventarul sușelor interesante, cercetările asupra metabolismului microorganismelor (degradări și sinteze), microbiologia aplicată trebuiau să rețină mai mult atenția specialiștilor. În ceea ce privește transferul de tehnologie de la cercetarea fundamentală către industrie, la Compiègne, Toulouse și în Institutul Pasteur existau trei centre de transfer care urmau să constituie punctele de întîlnire între cercetători, ingineri și industriași, întîlniri avînd ca scop dezvoltarea tehnologiilor, inclusiv în sectoare tradiționale atît de renumite ca fabricarea brînzeturilor sau vinificația. Cercetările fundamentale aveau să fie extinse, de asemenea, în unele domenii mai puțin cunoscute ca, de exemplu, izolarea de enzime care suportă temperaturi ridicate.

Pentru a defini orientările și strategiile esențiale, a coordona cercetările și a asigura dezvoltarea bioindustriei, la 19 iulie 1982 un program consacrat „înfloririi biotehnologiilor" a fost prezentat de către ministerul cercetării și industriei, după promulgarea, la 16 iulie, a legii de orientare și de programare pentru cercetarea și dezvoltarea tehnologică a Franței (această lege cuprindea șapte programe mobilizatoare, inclusiv cel asupra biotehnologiilor). Acest program a fost stabilit pentru o perioadă de trei ani de către comisia biotehnologiilor, creată în 1981, și care a fost inspirată de analizele anterioare conținute mai ales în rapoartele lui Gros, Royer și Jacob, și de Pelissolo (v. tabelul 11). Finanțarea programului se ridica la 1,1 miliarde de franci pentru 1982 și avea să atingă 1,4 miliarde de franci în 1983. Gestiunea programului era încredințată unei „misiuni" a Ministerului Cercetării și Industriei, în timp ce un comitet național, compus din reprezentanți ai instituțiilor economice și sociale avea sarcina de a defini, de două ori pe an, orientările și de a evalua activitatea; un comitet mai restrîns, constituit din oameni de știință și din membri ai administației, urma să coordoneze lucrările diverselor departamente ministeriale și organisme care participau la realizarea programului. Obiectivul acestuia din urmă era să „doteze industria biochimică franceză cu un potențial științific și tehnologic care să-i permită să reprezinte, către 1990, 10% din cifra de afaceri mondială a bioindustriilor".

Documentul programului rezuma cele trei categorii de cercetări care condiționau dezvoltarea biotehnologiilor: cercetările fundamentale asupra microorganismelor, celulelor animale și vegetale, enzimelor; studiile asupra reacțiilor biotehnologice (cinetică, randamente, cultura microorganismelor și a celulelor, inginerie enzimatică, instrumente de control, procedee de extracție și de purificare); cercetările orientate în domeniile farmaceutice, agroalimentare, din protecția mediului înconjurător și energiilor regenerabile.

Accentul se punea pe a doua categorie de cercetări, care corespund biotehnologiilor în sens strict. Se dădeau recomandări detaliate în ceea ce pri-

veşte acţiunea organismelor publice de cercetare, în special pentru obţinerea unor rezultate remarcabile în următoarele domenii: producerea de medicamente, de reactivi, de materii prime pentru industria chimică, ameliorarea producţiei agricole, lupta împotriva poluării. Un număr de aproape 40 de proiecte industriale, care erau deja în curs sau a căror abordare era iminentă, urmau să primească un ajutor de la Stat, ajutor estimat la şase milioane de franci pe trei ani.

Urmau să fie luate şi alte măsuri pentru extinderea pregătirii personalului specializat, pentru asigurarea transferului rezultatelor cercetărilor către industrie şi pentru o mai bună informare a publicului (în special în domeniul cercetărilor asupra recombinărilor genetice). Măsuri de reglementare urmau să completeze aceste programe : acordarea de credite şi măsuri fiscale pentru a susţine efortul de cercetare-dezvoltare, intervenţia asupra preţurilor materiilor prime, protecţia inventatorilor, supravegherea experienţelor de inginerie genetică.

Constituirea grupărilor de interes ştiinţific (GIS) a fost una din măsurile preconizate pentru ca acţiunea să aibă maximum de eficienţă. Grupurile de interes ştiinţific asociau laboratoare care depindeau de autorităţi administrative diferite, dar ale căror lucrări de cercetare erau înrudite.

GIS constituit la Toulouse cuprindea trei laboratoare. Cel mai important era Centrul de Cercetare de Biochimie şi de Genetică Moleculară, care era comun Centrului Naţional al Cercetării Ştiinţifice (CNRS) şi Universităţii Paul Sabatier; cercetările întreprinse aici de aproape o sută de cercetători şi de tehnicieni aveau ca obiect genetica procariotelor şi eucariotelor, structura şi funcţionarea membranelor bacteriilor, şi bioconversiile. Cel de al doilea laborator, comun CNRS şi Institutului Naţional al Cercetării Agronomice (INRA) era consacrat unor studii asupra simbiozelor dintre plante şi bacterii, pentru a mări eficacitatea lor şi, prin urmare, productivitatea plantelor respective. Cercetările aveau ca obiect şi anumite virusuri şi bacterii patogene ale plantelor. Cel de al treilea laborator era Departamentul de Inginerie Biochimică al Institutului Naţional al Ştiinţelor Aplicate (INSA), care colabora cu laboratorul de automatică şi de analiză a sistemelor CNRS şi care se ocupa de studiul cineticii dezvoltării microbiene, purificarea anumitor enzime şi optimizarea de reacţii enzimatice şi de procese metabolice importante pe plan industrial (automatizarea fermentaţiilor). În total, GIS reunea circa o sută de persoane la care se adăugau alte aproape o sută de persoane în urma începerii activităţii, lîngă Toulouse, a laboratorului lui Elf-Sanofi, ale cărui cercetări de inginerie genetică, enzimologie şi microbiologie erau completate de cercetări asupra seminţelor.

Pe lîngă laboratoarele care constituiau GIS avea să intre în funcţiune, în 1983, centrul însărcinat cu înlesnirea transferului către industrie a rezultatelor cercetărilor fundamentale sau aplicate. Centrul de transfer, a cărei realizare a necesitat un buget de 6,8 milioane de franci, urma, de asemenea, să acorde prestări de servicii micilor întreprinderi care nu au mijloace pentru efectuarea de cercetări proprii.

În plus, un număr de acţiuni pregătite în comun cum ar fi asocierea, contopirea sau crearea de instituţii de cercetare publice sau private au marcat, în Franţa, dezvoltarea cercetărilor şi aplicaţiilor biotehnologiei.

La 7 februarie 1980, trei organisme publice, Centrul Naţional al Cercetării Ştiinţifice (CNRS), Institutul Naţional al Sănătăţii şi al Cercetării

Medicale (INSERM), Institutul Național al Cercetării Agronomice (INRA) și Institutul Pasteur Foundation, au creat un grup de interes economic numit G3 (grupare de inginerie genetică), avînd misiunea să finanțeze și să realizeze cercetări aplicate și să asigure continuarea lor datorită cultivării de noi sușe de microorganisme, provenind din studiile de cercetare fundamentală efectuate în laboratoarele de inginerie genetică aparținînd acestor instituții. De asemenea, puteau fi încheiate contracte de dezvoltare, de către G3 cu industriași asupra unor programe care îi interesau. La Institutul Pasteur a fost înființat un laborator comun celor patru instituții pentru a primi și ameliora sușele izolate de cercetătorii lor. Aplicațiile proiectate priveau domeniile sănătății (producerea de hormoni, de enzime, și vaccinuri) al agronomiei (producerea de biofertilizanți), al luptei împotriva poluării, al energiei (biocombustibili) și al chimiei (obținerea de materii prime cu ajutorul microorganismelor cu genom modificat). Gruparea de inginerie genetică avea să contribuie la realizarea unei legături satisfăcătoare între cercetarea din microbiologie și aplicațiile ei.

În 1980 INRA, CNRS și Institutul Pasteur s-au asociat cu două întreprinderi franceze, Elf-Aquitaine și Societatea Comercială a Potasiului și Azotului, pentru a duce la bun sfîrșit un program de cercetare asupra fixării biologice a azotului atmosferic. Acest program, desfășurat pe mai mulți ani, avea ca obiect ameliorarea eficacității fixării simbiotice a azotului (leguminoase) și de a o extinde la cereale, datorită progreselor tehnicilor de recombinare genetică. Era așadar vorba de un domeniu de interes socio-economic evident, după exemplul dat de S.U.A. și Marea Britanie.

Proiectul societății franceze Transgène s-a născut la întîlnirea dintre doi înalți funcționari ai Băncii din Paris și din Olanda, R. Lattès și M. Jaugey, și doi directori din cercetare de la Universitatea Louis-Pasteur din Strasbourg (P. Chambon) și de la Institutul Pasteur din Paris (P. Kourilski). Cinci grupuri financiare și industriale s-au asociat pentru a fonda și finanța această societate: Asigurările generale din Franța, BSN-Gervais-Danone, Elf-Aquitaine/Sanofi, Moet-Hennessy și Paribas. Ele asigurau o finanțare care putea atinge 81 de milioane de franci pe perioada primilor cinci ani de funcționare a societății Transgène. Dar una din caracteristicile originale ale acestei creații a fost, pentru oamenii de știință fondatori și pentru cei care au investit, stabilirea unor relații exemplare cu marile centre de cercetare franceze cărora le-a fost atribuit 15% din capitalul societății Transgène, din care 3% Universității Louis-Pasteur și 12% Grupului de Inginerie Genetică (G3). În plus, oamenii de știință fondatori au creat o asociație fără scop lucrativ pentru a favoriza cercetarea căreia i-a fost atribuit 8% din capitalul societății Transgène. Aceste fonduri, reprezentînd 23%, au fost acordate cu titlu de donație. În sfîrșit, cele cinci grupuri financiare fondatoare au rezervat 12% din acțiuni pentru unele persoane-colaboratori, cercetători, consultanți sau experți — care ar aduce o contribuție esențială la dezvoltarea acestei societăți.

Studiile efectuate de Transgène se realizau pe bază de programe autonome sau de programe pe bază de contracte de cercetare. Primele se realizau pe baza resurselor proprii ale societății pînă la stadiul în care ofereau posibilitatea unei valorificări reciproc avantajoase cu industria; aceasta putea colabora, de asemenea, la programe autonome de la bun început.

După anunțarea creării societății Transgène, la 25 iunie 1980, recrutarea de specialiști avea să se facă în august-septembrie 1980 și primele lucrări

de cercetare au început în cursul primului trimestru al anului 1981, în domeniile microbiologiei industriale, bioenergiei și sintezei de substanțe terapeutice. După aproape doi ani de la crearea societății, cercetătorii ei au reușit, în martie 1982, să cloneze gena interferonului γ și, în iulie 1982, să sintetizeze cu ajutorul celulelor de *E. coli* o proteină a virusului turbării. Aceste două realizări deschideau calea unor aplicații importante, în special ale producerii unui vaccin antirabic mai ieftin, și aduceau dovada dinamismului acestei societăți, compuse din 45 de persoane, dintre care 20 de cercetători aparținînd la opt naționalități diferite și 28 de tehnicieni.

În septembrie 1980, după Transgène, o altă societate era în curs de constituire: Genetica. Ea urma să aibă drept acționar principal pe Rhône-Poulenc, care anterior hotărîse să se echipeze cu un laborator de tip P3, capabil să-i permită realizarea experiențelor esențiale de recombinări genetice utile numeroaselor activități ale marelui grup farmaceutic.

Pe plan industrial, se intenționa să se creeze în Franța un vast ansamblu Bio-France, de talia marilor grupuri internaționale, de exemplu Merck, (S.U.A.) și grupul german Hoechst. Bio-France urma să reunească grupul Mérieux și Institutul Pasteur Production și, de asemenea, grupul Rhône-Poulenc, Sanofi, Fundația Mérieux și Fundația Pasteur.

Institutul Pasteur nu s-a interesat de aplicațiile industriale ale lucrărilor cercetătorilor săi decît la începutul anilor '70. Într-adevăr, în 1972 era creată, în cadrul institutului, o societate de „aplicare în practică" care avea să devină Institutul Pasteur Production (IPP), însărcinat cu exploatarea industrială și comercială a cercetărilor. În 1980, cifra de afaceri a IPP atingea 230 de milioane de franci. Producția tradițională a vaccinurilor și serurilor era completată de o difersificare a activităților și anume în domeniul cancerologiei, al luptei antivirale (interferon), al mijloacelor de diagnostic imunologic și al recombinărilor genetice. În 1980, noile activități ale IPP au fost marcate de producerea unui interferon leucocitar și de elaborarea unui vaccin anti-hepatită B cu concursul Institutului de Virusologie din Tours.

Institutul Mérieux era, în 1980, cu o cifră de afaceri de un miliard de franci (dintre care 73 de milioane realizate la export), unul dintre primii producători mondiali de produse în domeniul medicinei umane și veterinare. Au fost create filiale în Argentina, Botswana, Brazilia, Chile, Iran, R.F.G., Spania, S.U.A., și Uruguay. Institutul Mérieux aparținea (51%) lui Rhône-Poulenc, familia Mérieux păstrînd 20% din acțiunile grupului. O societate-soră dar distinctă, Bio-Mérieux, controlată în proporție de 51% de Mérieux și 49% de firma americană Beckton-Dickinson, producea reactivi de laborator. O parte însemnată a activității Institutului Mérieux consta în pregătirea produselor derivate din sînge de origine placentară, care erau vîndute în străinătate, din cauza monopolului deținut în Franța de către centrele de transfuzie de sînge pentru producerea și comercializarea substanțelor provenind din sînge.

Centrele de transfuzie de sînge beneficiau în Franța, din 1952, de monopolul prelevării și transfuziei de sînge. Aceste centre nu puteau obține nici un profit de pe urma unei activități bazate pe acțiunea benevolă și donarea de sînge și ele livrau centrelor de asistență medicală derivatele sanguine la un preț fixat de stat. Din cele 200 de centre de transfuzie de sînge existente în 1980, opt dețineau mijloacele de realizare a separării sîngelui în fracțiuni, a cărui transfuzie se făcea în funcție de nevoile bolnavului sau accidentatului:

globule roșii (anemii, reanimare chirurgicală), globule albe și globuline (leucemii, grefe de măduvă, chimioterapie), plasmă (arsuri, denutriție, stări de șoc), albumină (arsuri grave, tulburări ale volumului circulator), fibrinogen (hemoragii), fracțiuni antihemofilice, imunoglobuline. În 1978, în Franța, au fost efectuate peste 4 milioane de prelevări sanguine și nevoile de derivate sanguine erau în general acoperite pe plan național, în ciuda problemelor de organizare și a dificultăților financiare.

Au fost examinate mai multe proiecte de colaborare între acești trei parteneri francezi din domeniul bioindustriei: Institutul Pasteur Production, Institutul Mérieux și Centrele de Transfuzie de Sînge, în așa fel încît să fie evitată dublarea activităților și să se permită desfășurarea de cercetări în comun și exploatarea mai rapidă a rezultatelor lor. Unele programe de acțiune comune între Institutul Pasteur și Institutul Mérieux au avut ca obiect realizarea și comercializarea de produse de diagnostic și tratament ale alergiilor, vaccinuri fabricate prin tehnici de recombinare genetică (hepatită B, poliomielită, febra aftoasă). Această colaborare avea loc și în afara Franței: în Senegal se producea vaccin antihepatită B pornind de la plasmă umană; în Institutul Pasteur din Tunis se produceau gamaglobuline și vaccin antirabic.

În februarie 1982 s-a anunțat crearea la Dakar a unei unități de producere a unui vaccin protector împotriva hepatitei virale de tip B. Acest vaccin avea să fie fabricat la Institutul Pasteur din Dakar cu concursul Institutul Pasteur Production (IPP) și al lui Elf-Aquitaine/Sanofi. În 1976 o echipă franceză condusă de Maupas (Institutul de Virusologie din Tours) elaborase un procedeu de fabricare a acestui vaccin obținut pornind de la prelevări sanguine de la așa-numiții subiecți „HBs pozitivi", subiecți care aveau în serul lor antigenul viral HBs. Recuperarea acestor seruri și procedeele de tratare a lor necesitau tehnici complexe, ceea ce făcea ca acest vaccin să fie unul dintre cele mai scumpe de pe piață (vaccinarea propusă de Institutul Pasteur consta în trei injecții la interval de o lună și repetarea după un an, și se ridica, în 1981, la aproape 100 de dolari). După ce IPP a obținut autorizația de lansare pe piață a acestui vaccin în 1981, în Franța se realiza pentru prima oară în lume protejarea subiecților expuși într-un grad înalt riscului de contaminare, ca de exemplu unii bolnavi sau personalul unor servicii spitalicești.

Tot în 1981, societatea americană „Merk, Sharp and Dohme" (M.S.D.), unul din cele mai mari grupuri farmaceutice mondiale a obținut de la „Food and Drug Administration" autorizația de a produce în S.U.A. un vaccin contra hepatitei virale, a cărui comercializare era prevăzută pentru semestrul al doilea din 1982. Și Elveția trebuia să pună în comerț vaccinul Institutului Pasteur Production. Concurența risca să devină dură între I.P.P. și firma americană, care invoca prioritatea brevetului depus în Statele Unite, la 18 ianuarie 1972, în contul Institutului de Cercetări în Domeniul Cancerului din Philadelphia, de către Blumberg (premiul Nobel în medicină). Acesta a fost cel dintîi care a pus în evidență antigenul HBs în unele seruri umane, stabilind apoi o legătură între acest antigen și hepatita virală de tipul B. Marele grup farmaceutic de peste Atlantic insista de asemenea asupra faptului că, atît compoziția cît și modul de fabricare a vaccinului său erau diferite de cele ale produsului francez. În definitiv, fiecare grup încerca să convingă un număr cît mai mare de țări să efectueze teste clinice cu vaccinul său, în vederea comercializării acestuia. O firmă japoneză, „Green Cross Corporation",

din Osaka, achiziționase dreptul de fabricație pentru vaccinul francez și plănuia chiar vînzarea acestuia pe piața americană, unde, conform unui studiu făcut de „Merk, Sharp and Dohme" în 1978, 25 de milioane de persoane ar fi trebuit protejate împotriva hepatitei de tip B (personal medical și paramedical, bolnavi aflați sub hemodializă, hemofili, bolnavi supuși operațiilor chirurgicale, militari).

Interesul în fabricarea vaccinului Institutului Pasteur la Dakar (pînă la un milion de doze pe an, începînd cu colectările de sînge organizate, la început local, apoi în toată Africa) rezida în prevenirea uneia din cele mai grave forme de cancer, cancerul primar al ficatului. Într-adevăr, cercetările efectuate începînd din 1978 de către Institutul de virusologie din Tours (Maupas), sub egida Ministerului francez al cooperării și a autorităților senegaleze, stabiliseră rolul deținut de virusul hepatitei B în geneza acestui cancer, în zona intertropicală. Programul franco-senegalez avea ca obiectiv vaccinarea a două sute de mii de copii contra hepatitei de tip B și de a-i urmări apoi, timp de douăzeci de ani, în scopul de a verifica posibilitatea prevenirii cancerului. Societatea franceză Matra participa la această experiență excepțională furnizînd material ecografic pentru diagnosticul precoce al cancerului la ficat, în vreme ce Renault oferea vehicule pentru deplasarea a cinci echipe de vaccinare, echipa prevăzute nu numai cu vaccinul contra hepatitei de tip B, dar încadrîndu-se și într-un program mai vast, de prevenire a difteriei, a tetanosului, a tusei convulsive, rujeolei, a poliomielitei și febrei tifoide. Organizația Mondială a Sănătății era direct asociată la acest proiect de amploare.

Operațiuni analoage fuseseră realizate în Taiwan de către „Merk, Sharp and Dohme", care-și experimentau propriul vaccin în cadrul unui acord între S.U.A. și Taiwan.

În Olanda a fost creat, în mai 1981, un comitet guvernamental pentru coordonarea cercetărilor în domeniul biotehnologiei și pentru lărgirea aplicabilității lor. Membrii comitetului proveneau din industrie, din universități și din cadrul Organizației Guvernamentale pentru Cercetarea Științifică Aplicată (TNO) (Becker, 1982; Schuuring, 1982).

Acest comitet recomandase insistent guvernului să mărească bugetul alocat proiectelor de biotehnologie cu cel puțin 75 de milioane florini între 1982 și 1988, astfel încît să poată fi promovate inovațiile în acest domeniu. Creditele urmau să fie prelevate din fondurile alocate inovațiilor industriale. În ce privește sectoarele prioritare ale cercetării aplicate, comitetul estima ca fiind recomandabilă opțiunea pentru acele domenii în care întreprinderile olandeze dețineau un avans și o competență recunoscute: agricultura, industria laptelui, fermentațiile și producția de antibiotice. Pe de altă parte, companiile olandeze existente — mari sau mijlocii — păreau mult mai în măsură să compenseze deficitul din dezvoltarea biotehnologiei, decît micile întreprinderi nou create. Totodată, comitetul recomanda întărirea cooperării dintre universități și industrie, de natură să confere Olandei un loc important în acest domeniu și să determine progrese serioase în activitatea industrială în următorii zece-douăzeci de ani.

Un exemplu de astfel de progres era cel al firmei „Gist-Brocades", creată în 1870 la Delft sub numele de „Royal Netherlands Fermentation Industrie" pentru a produce levuri de panificație. Începînd din 1945, pe lîngă producția de levuri și alcooluri prin fermentație, grupul se specializase în

sinteza antibioticelor și a steroizilor, ca și în producția de enzime. În 1968 intervine fuziunea cu „Brocades Stheeman and Pharmacia", unul din cele mai importante laboratoare farmaceutice olandeze. În 1980, acest grup fabrica 20% din producția mondială de penicilină și își reconsiderase activitatea de cercetare pentru a conferi sectoarelor farmaceutic și biotehnologic un potențial echivalent. În 1982, departamentul pentru biotehnologie beneficia de 280 de cercetători și 25 de milioane de florini ca investiție pentru finanțarea construcției de laboratoare de microbiologie la Delft. Încă din 1980 exista o strînsă colaborare între „Gist—Brocades" și „Shell International Research in Biological Engineering".

Construirea, sub egida T.N.O., a unui laborator de tip P3 era prevăzută pentru finalizare în 1983, iar funcționarea sa a fost supusă avizului unui alt comitet, creat în mai 1981, Comitetul pentru Consecințele Etice ale Ingineriei Genetice. Legislația olandeză stipula, într-adevăr, ca funcționarea laboratoarelor de tip P3 să fie decisă la nivel național, în vreme ce laboratoarele de tip P1 sau P2 erau supuse numai simplei autorizații municipale. În 1982, tendința era mai degrabă de natură restrictivă, autoritățile solicitînd maximum de precauții și măsuri de protecție suplimentare împotriva eventualelorpericole provenind din experiențele genetice. Unii specialiști considerau totuși că legislația olandeză era mai strictă decît în alte țări, că trebuiau stabilite reguli la scară națională, respectate ca atare și că, în sfîrșit, autorizațiile de cercetare trebuie acordate mai rapid.

Italia avea un program biotehnologic destul de avansat: firma SNAM-Progetti poseda, în particular, un important laborator în acest domeniu, la Monterotondo, lîngă Roma. „Farmitalia Carlo Erba", cel mai mare grup farmaceutic italian (1 290 de persoane, 44 miliarde de lire cifră de afaceri în 1981) urma să investească în 1982 sume importante pentru crearea unui laborator de inginerie genetică pentru a realiza programul de cercetări comune ale grupului și ale Institutului de Genetică Biochimică și Evolutivă a Consiliului Național al Cercetării din Pavia. Cercetările aveau ca obiect principal interferonii umani, anticorpii monoclonali și cultura de celule vegetale.

În Suedia, cercetările de biotehnologie erau concentrate la Universitățile din Lund și Upsalla, însă aici cercetările de microbiologie aplicată și de biologie moleculară și celulară se dezvoltaseră încă de la începutul anilor '50.

Societatea Kabigen AB a fost creată în 1979, la Stockholm, și era specializată în cercetări genetice aplicate în farmacie și agricultură. 50% din acțiuni erau deținute de Kabi Vitrum AB, societate de stat suedeză, 25% de societatea de produse zaharoase „Swedish Sugar", iar 25% de societatea „Hilleshög AB", pecializată în cereale.

Comisia Pieței Comune a prezentat în 1980 un program pentru 4 ani (1982—1986) de cercetare — dezvoltare a „ingineriei biomoleculare" (Walgate, 1980 a). Contribuția financiară a Comunităților trebuia să atingă 23,5 milioane unități europene de cont (ECU), adică echivalentul a aproximativ 32 milioane dolari și a circa 600 000 dolari anual de fiecare stat membru. Bugetul era firav față de efortul național al R.F.G., dar era comparabil cu cel aferent lui „Science and Engineering Research Council" din Marea Britanie. Firmele industriale europene recomandau rapida realizare a acestui program comun. Cele șase proiecte ce constituiau programul urmau să rezolve un număr de obstacole tehnice aflate în calea dezvoltării biotehnologiei și, pe de altă parte, să răspundă unor probleme specific europene. Primul proiect privea tehnologia

enzimatică (cinetica reacțiilor multi-enzimatice, imobilizarea mai multor enzime și regenerarea cofactorilor, stabilizarea de enzime necesitînd lipide, stabilizarea organitelor subcelulare, precum mitocondriile, cloroplastele, peroxizomele și complexele enzimatice închise în membrane, precum thylacoizii, microzomii, precum și celulele intacte ale levurilor și organismelor eucariote). Al doilea proiect viza punerea la punct a metodelor de detoxicare în medicina umană și în industrie. Al treilea privea transferul și recombinarea genelor în celule de *E. coli*, de *Saccharomyces cerevisiae* și de alte microorganisme, spre o mai bună cunoaștere a naturii procesului de recombinare și pentru a înlătura dificultățile de expresie ale genelor. Cel de-al patrulea proiect avea ca scop selecționarea tulpinilor microbiene cu genom modificat, mai performante pentru bioindustrie decît *E. coli*, aparținînd genurilor *Actinomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Penicillium* , prin folosire de plasmide, viruși și ADN mitocondrial ca vectori ai ADN-ului recombinat; la plante, cercetările de aceeași natură, trebuiau să utilizeze plasmidele de la *Agrobacterium*, dezoxiribovirusurile, cloroplastele și mitocondriile. Al cincilea proiect privea stabilitatea, reglarea și expresia genelor transferate, în vreme ce al șaselea proiect era dedicat ameliorării metodelor de detectare a contaminărilor în tulpinile utilizate în fermentare. Fiecare proiect includea participarea a 12 grupe de cercetare; acestea erau formate în medie din 3 cercetători, doi tehnicieni, un laborant și o secretară.

Consiliul de Miniștri al Cercetării din Comunitatea Europeană și-a dat acordul pentru executarea acestui program de „inginerie biomoleculară" în două etape, de la 1 aprilie 1982 la 31 martie 1984 și de la 1 aprilie 1984, la 31 martie 1986. În prima fază a programului, au fost alocate credite în valoare de opt milioane unități de cont, dintre care 20% pentru formarea personalului.

Formarea personalului calificat

Dezvoltarea cercetărilor și aplicațiilor în microbiologie și în diverse sectoare ale biotehnologiei a creat necesitatea personalului calificat, căreia țările au încercat să-i răspundă făcînd apel la specialiști din disciplinele biologice (microbiologie, genetică, biologie moleculară și celulară, enzimologie, fiziologie celulară, imunologie, farmacologie) și din științele ingineriei (chimice și biochimice, sau agronomie). Acești specialiști se formează în laboratoarele de cercetare conform noilor obiective, inginerul chimist devenind mai mult biochimist, iar microbiologul interesîndu-se în primul rînd de procedeele și tehnicile de producere, la scară mai mică sau mai mare, a diverselor substanțe necesare domeniului medical, farmaceutic sau alimentar. Specialiști eminenți — între care mai mulți laureați ai premiului Nobel — erau chemați, pe de altă parte, să prezideze consilii științifice sau să conducă departamentele de cercetare ale unor firme biotehnologice, împărțindu-și cel mai adesea timpul între acestea și laboratoarele universitare. Concurența era, ce-i drept, foarte puternică între companii, fiecare căutînd să recruteze cei mai buni specialiști pentru a face cel dintîi descoperirile de care depindea însăși existența firmei.

La sfîrșitul lunii octombrie 1981, „Science and Engineering Research Council" (SERC) al Marii Britanii a creat o nouă direcție, în vederea promo-

vării colaborării dintre industrie și instituțiile academice specializate în biotehnologie, urmărind, pe de altă parte, păstrarea în țară a cercetătorilor de valoare. Inițiativa răspundea unei recomandări din raportul Spinks, care subliniase dificultatea recrutării de ingineri specializați în punerea la punct a noilor tehnici de producție, aceștia dovedindu-se în general mai reticenți în acceptarea de posturi în domeniile biotehnologice, decît microbiologii. Noua direcție a depus, așadar, eforturi deosebite pentru a crea locuri sigure de muncă, spre a stăvili emigrarea cercetătorilor britanici și pentru a-i atrage înapoi acasă pe cei angajați peste hotare. Acest exod al competențelor devenise o preocupare împărtășită deopotrivă de „Royal Society", care formase un comitet special însărcinat cu publicarea unui raport privitor la învățămînt și biotehnologie. Comitetul estima ca fiind necesar un număr de o mie de licențiați și de patru mii de tehnicieni suplimentari în biotehnologie, pentru deceniul 1980 — 1990. Comitetul nu considera, totuși, utilă introducerea cunoștințelor specializate de biotehnologie pentru obținerea licenței (B.Sc.), rezervîndu-le numai pentru nivelul post-gradual (M.Sc.), accentul fiind pus, în schimb, pe cunoștințele de biologie și chimie existente în programele de licență. În același timp, acest Comitet susținea o altă recomandare a raportului Spinks, referitoare la crearea a încă 20 de posturi, cel puțin, un învățămînt și cercetare în cîteva universități britanice.

În Franța, numărul biotehnologiștilor era de două sute în 1978. S-au depus eforturi pentru crearea unei mase de personal calificat — cercetători și tehnicieni — indispensabilă în lupta contra concurenței japoneze și americane, ca și pentru reducerea dependenței economice. Eforturi justificate cu atît mai mult cu cît nivelul cercetării fundamentale în principalele domenii ale științei, cu implicații biotehnologice, era în Franța, ca și în alte cîteva țări europene, mai mult decît satisfăcător. Unele școli de ingineri se adaptaseră noilor dezvoltări ale bioindustriei, creînd posturi în biotehnologie. Există de asemenea centre specializate, precum Institutul Național de Științe Aplicate de la Toulouse (în biochimie), Universitate de Tehnologie de la Compiègne, Școala Națională Superioară pentru Industrii Alimentare din Lille (în colaborare cu Institutul Național de Cercetări Agronomice) și care pregătesc cîteva zeci de ingineri și specialiști pentru laboratoarele de cercetare și pentru unitățile de producție în bioindustrie. O anumită prudență caracterizează această politică de pregătire a cadrelor, în măsura în care lumea își amintește încă moda biochimiei și biologiei moleculare, ce au determinat formarea, începînd de la mijlocul anilor '60, a cîtorva sute de licențiați, care nu-și aflaseră, pe urmă, posibilități de angajare și din care un mare număr fuseseră recrutați de industria agroalimentară.

Universitatea din Compiègne s-a aflat în centrul unei experiențe originale de colaborare cu industria. Într-adevăr, pe planul pregătirii profesionale, studenții făceau, după trei ani de studiu, un stagiu de șase luni într-o întreprindere industrială înainte de a-și obține diploma de inginer. Pe planul cercetării, industria finanța echipamentul greu și semna contracte cu universitatea (două milioane de dolari pe an, în 1981): în 1974 a fost creat Institutul de Tehnologie a Suprafețelor Active, care asigura legătura dintre laboratoarele universitare și lumea industrială; în 1978, s-a înființat un birou de informații pentru a răspunde la problemele ridicate de industrie. Pe planul personalului, un mare număr de studenți cuprinși în contracte provenea din industrie (o treime, în cazul Departamentului biologic).

În R.F. Germania, în afara laboratoarelor de microbiologie generală și aplicată existente de mai multe decenii în orașe precum Berlin, Göttingen și Tübingen, fuseseră înființate, începînd din 1974, noi institute sau departamente în mai multe universități (Bochum, Braunschweig, Dortmund, Hanovra, Hohenheim, Münster, Siegen), pentru a putea recupera handicapul în materie de formare a cercetătorilor și tehnicienilor (numai trei sute de cercetători științifici erau implicați în domeniul de biotehnologie la începutul anilor '70).

Planificarea specializării cadrelor nu este deloc ușoară, dată fiind apariția de noi domenii de cercetare cu aplicații biotehnologice, apariții greu de prevăzut. Mai mult decît o problemă de efective de cercetare, este vorba mai ales de adaptarea la o evoluție în continuă schimbare.

Această capacitate de adaptare este prodigioasă în Japonia, unde diversificarea activității întreprinderilor este o regulă și unde marii specialiști în microbiologie provin din industriile agroalimentare. Japonia a acordat microbiologiei și enzimologiei un loc important în învățămîntul superior, astfel încît laboratoarele universităților din Kyoto, Osaka și Tokio și-au început activitatea în acest domeniu încă din 1910—1920. Un atare efort permanent susținut, ca și strînsa colaborare dintre laboratoarele universitare și firmele industriale, i-au permis Japoniei să dispună, în 1981, de 12 000 microbiologi, dintre care 70% lucrau în societăți particulare la dezvoltarea tehnologiilor de vîrf. 20 pînă la 25% erau angajați în universități și laboratoare particulare de cercetare și 5 pînă la 10% lucrau în instituții publice [1] (Gregory, 1982). În genetică (recombinări de acizi nucleici), domeniu în care Japonia era ceva mai în urmă, numărul cercetătorilor depășea o mie în 1984; cinci institute particulare de cercetare își consacrau activitatea, în 1982, acestor cercetări și mai multe societăți dispuneau de laboratoare cu nivel de securitate P3.

În Statele Unite ale Americii, organizarea studiilor superioare în domeniul biologiei permitea, grație unui „trunchi" comun, specializarea echivalentă în domeniul medical și în industria fermentativă, ca și trecerea normală dintr-un domeniu în celălalt. În plus, relațiile din ce în ce mai strînse existente între instituțiile universitare și întreprinderilor bioindustriale favorizau orientarea studenților către filiere sau debușeuri biotehnologice. Însă inginerii biochimiști, experții în fermentații capabili să pună în mișcare și să supravegheze instalațiile industriale de mare capacitate erau insuficienți. Biologii erau mai numeroși decît inginerii, în întreprinderile specializate. Cu excepția Institutului de Tehnologie din Massachusetts (MIT), programele de pregătire în biotehnologie nu erau prea răspîndite în universitățile americane în 1980, ceea ce explică intensitatea căutării, de către societățile particulare, a specialiștilor nu prea numeroși cu pregătire superioară. Unele universități, precum cea din Baltimore, au luat în 1981 decizia de a crea programe de învățămînt pentru biotehnologie la nivelul „Master of Sciences".

Formarea personalului calificat nu se limitează la ingineri și cercetători. Ea privește, de asemenea, pregătirea tehnicienilor pentru laboratoare, a căror importanță nu rezidă numai în realizarea experiențelor, în întreținerea aparaturii și în buna ei utilizare, dar și în desfășurarea operațiilor, obositoare, dar

[1] Între 1970 și 1980, numărul total al cercetătorilor crescuse de la 158 000 la 272 000, adică, în procente, cu 72%.

indispensabile, precum izolarea și selecția tulpinilor microbiene, care condiționează într-o măsură decisivă succesul multora din întreprinderile bioindustriale.

Noile raporturi între învățămîntul universitar și industrie

Dezvoltarea bioindustriei în țările industrializate a creat condițiile unor noi raporturi între instituțiile universitare și întreprinderile industriale. Stabilirea acestor legături a făcut obiectul unei largi dezbateri privind rolul și finalitățile instituțiilor academice, independența lor față de lumea industrială; luările de poziție au evidențiat o gamă largă de opinii, mergînd de la ideea cooperării cît mai stricte și pînă la autonomia activității în domeniile respective.

Astfel, eminenți profesori universitari au fost de acord cu faptul că nu există nici un inconvenient în formarea de specialiști pentru industriile nou apărute — în cadrul laboratoarelor universitare, estimînd că simbioza dintre industrie și lumea academică nu poate fi decît benefică pentru ambii parteneri, după cum a demonstrat-o, de pildă, dezvoltarea industriei chimice. Totodată, o anume separare a industriei de învățămîntul universitar le apărea ca necesară, cea din urmă trebuind să se conformeze logicii interne a științei și propriei sale dinamici. Studiul problemelor nu trebuie legat exclusiv de nevoile predeterminate ale industriei. Dar cercetarea are o continuitate intensă a problemelor, de la cele definite de logica interioară a științei și pînă la cele puse de mediul înconjurător, iar biotehnologia oferă destule exmple pozitive ale acestei continuități.

În S.U.A., pînă la cel de-al doilea război mondial, cercetătorii americani puteau utiliza după bunul plac brevetele descoperirilor lor, dar cel mai adesea erau preocupați să aducă beneficii materiale instituțiilor pentru care lucrau. De exemplu, în 1907, Cottrell, profesor de chimie fizică la Berkeley, a descoperit o metodă de luptă împotriva poluării cu acizi produși de uzinele firmei Du Pont. El a propus transferarea drepturilor acestui brevet la Universitatea din California, dar propunerea a rămas fără nici o urmare. Cottrell a părăsit universitatea și a creat „Research Corporation", pentru a veni în sprijinul cercetătorilor care doreau să-și exploateze descoperirile pentru binele public, dar cărora nu le plăcea să se ocupe de brevete. Cottrell și-a donat, astfel, brevetul lui „Research Corporation" și a negociat acorduri cu universitățile Harvard, Stanford și în California, cu Institutul de Tehnologie din Massachusetts, în vederea concesionării de brevete, în schimbul unui procent însemnat din dobînzile provenite din exploatarea acestor brevete (Yanchinski, 1981). În 1945, peste 52 de institute au primit astfel fonduri, alocate pentru diverse proiecte, cum au fost primele rachete sau sinteza vitaminelor.

Un alt exemplu interesant este cel al lui Steenbock, de la departamentul pentru biochimie al Universității din Wisconsin. El a descoperit în anii '30 un procedeu de iradiere a alimentelor pentru creșterea conținutului de vitamina D și a propus universității să devină beneficiar al profiturilor rezultate din exploatarea brevetului. Descoperirea era foarte importantă pentru dezvoltarea tinerei industrii de oleomargarină, dat fiind că permitea acestui produs

să înlocuiască untul. S-a creat atunci o fundație independentă, pentru controlul exploatării descoperirii lui Steenbock (Yanchinski, 1981). Astfel a luat ființă „Alumni Research Fund" (WARF) din Wisconsin, instituție particulară care comercializa brevetele depuse de cercetătorii Universității din Wisconsin. O dată amortizate cheltuielile administrative, toate veniturile reveneau universității. De-a lungul anilor '30, WARF a procurat, astfel, 100 000 dolari pe an pentru instituția universitară respectivă. Aceste resurse suplimentare au favorizat în special dezvoltarea departamentului de biochimie (în 1950, 30% din biochimiștii americani s-au format la Universitatea din Wisconsin). Contribuția WARF a crescut pînă în 1981 la peste un milion de dolari, consacrați cercetărilor fundamentale. Raporturile existente între WARF și universitate nu au împiedicat-o pe aceasta din urmă să stabilească alte legături cu industria. Astfel s-au construit pe terenurile universității, în centrul orașului Madison, laboratoare în cadrul cărora cercetătorii puteau efectua lucrări pentru alte întreprinderi particulare (Yanchinski, 1981).

De fapt, universitățile americane dispuneau de mai multe mijloace pentru a obține din invenții beneficiile suplimentare de care aveau nevoie. Contrar situației din Anglia, unde oamenii de știință erau obligați să-și treacă invențiile prin intermediul lui „National Research Development Corporation" (care fusese încorporată lui „British Technology Group"), fiecare universitate americană era liberă să încheie un acord între compania interesată și cercetătorul însărcinat cu cea mai mare parte a activității. Marile universități, precum Stanford sau cea din Los Angeles, California (UCLA) angajaseră avocați pentru a le redacta contractele în cele mai bune condiții, ținînd înainte de toate seama de fondul de beneficii al brevetelor și de avantajele financiare derivate din acestea. La sfîrșitul anului 1980, după mai mulți ani de negocieri și de presiuni politice, universitățile americane au reușit să obțină votarea, în Congresul S.U.A., a unei legi care să le permită exploatarea comercială directă a rezultatelor oricărei cercetări efectuate din fondurile guvernului federal (Dickson, 1980 a).

Diminuarea resurselor a obligat universitățile să caute alte mijloace de finanțare, respectiv prin tratarea cu firmele industriale. Guvernul american se arată favorabil unei atari tendințe, însă membrii corpului profesoral nu era integral de acord cu acest subiect: Weissmann, directorul lui „Biogen S.A.", estima, de pildă, că departamentul de genetică al Universității din Zürich (pe care îl conducea) era în mod sigur capabil să realizeze primele stadii în lucrările de recombinare genetică vizînd producția de interferon, dar că numai compania pe care el o prezida putea să furnizeze milioanele de dolari necesari trecerii la producția de serie. Cohen considera această colaborare drept întru totul normală, pledînd pentru stabilirea de relații cu cît mai multe firme. Zinder, profesor de genetică la Universitatea Rockfeller, critica, însă orice asociere între industrie și universitate pe plan financiar, comparînd banii rezultați dintr-o asemenea afacere cu un virus, care, deși favorizează creșterea organismului gazdă, sfîrșește prin a-l ucide.

Era greu de negat existența unor probleme, precum extinderea caracterului secret al cercetărilor întreprinse în colaborare cu industria, stabilirea priorităților în descoperiri, conflictele existente între oamenii de știință angajați în cercetarea fundamentală și cei orientați înspre cercetări cu strictă aplicabilitate comercială, apoi diferențele de salarizare, posibilitatea folosirii studenților la utilizarea instalațiilor universitare cu fonduri provenind din

bugetul universității. A fost dat ca exemplu cazul Universității californiene de la San Francisco. Aceasta acceptase o finanțare din partea lui „Howard Hughes Medical Institute", creînd, în consecință, disensiuni între cercetătorii departamentului de genetică. Yamamoto, profesor de genetică la această universitateate, afirma că disensiunile puteau antrena grave inconveniente pentru conducerea cercetării, care depindea, atît de schimbul liber de idei, cît și de activitatea experimentală (Yanchinski, 1981).

Astfel de probleme explică atitudinea Universității Harvard, care a creat un comitet pentru conflictele de interese, în vederea obligării personalului de a-și face cunoscute toate activitățile extrauniversitare. Acestea nu trebuiau să depășească 20% din timpul de muncă. Universitatea Harvard studia posibilitatea de a participa — în a doua jumătate a anului 1980 —la constituirea unei societăți însărcinate cu exploatarea invențiilor membrilor săi, în domeniul recombinărilor genetice. Ptashne, profesor de biochimie și biologie moleculară, făcuse o propunere în acest sens, el fiind autorul, împreună cu Kanaguchi, al unei noi metode de clonare a genei interferonului fibroblastic, inserînd această genă într-o plasmidă de *Escherichia coli* la nivelul unui sit în care expresia sa era mult superioară. Propunerea lui Ptashne avea drept scop procurarea de noi resurse financiare universității și nu era străină de faptul că unul dintre colegii săi — Walter Gilbert, laureat al premiului Nobel — fusese autorizat să creeze și să îndrume societatea „Biogen" (al cărei președinte și era, pe durată limitată), păstrîndu-și în același timp calitatea de profesor și membru al universității. Însă propunerea lui Ptashne a fost respinsă în noiembrie 1980 de către consiliul universității, iar președintele lui Harvard preciza cu acea ocazie că „păstrarea valorilor academice este de o importanță vitală pentru universitate, iar participarea la o astfel de companie ar genera o serie de conflicte" (Dickson, 1980 d). Trebuie subliniat că Universitatea Harvard se interesase încă din 1975 de exploatarea invențiilor provenind din cercetarea fundamentală. Crease chiar un birou de încurajare a preluării de brevete pentru invențiile elaborate în universitate și pentru acordarea drepturilor aferente.

Autoritățile administrative de la Facultatea de Agricultură și Mediu Înconjurător a universității din Davis, California, s-au opus vărsării de către firma „Allied Corporation" a unei subvenții de 2,5 milioane dolari în contul unuia dintre cercetătorii săi, specialist în genetică vegetală (Yanchinski, 1981). La rîndul lui, „Massachusetts Institute of Technology" i-a fost propusă o donație de 20 milioane dolari de către Edwin Whitehead (președintele companiei „Technicon Corporation") pentru crearea unui institut însărcinat cu comercializarea inovațiilor și descoperirilor făcute de MIT. Pe lîngă această donație inițială de 20 milioane dolari, cheltuielile de funcționare urmau să fie acoperite printr-o subvenție anuală de cinci milioane dolari. La moartea sa, Whitehead promitea să lase Institutului o sută de milioane de dolari. Dacă o astfel de propunere ar fi fost acceptată, „Whitehead Institute for Biomedical Research" ar fi avut legături exclusive cu MIT: cercetătorii săi ar fi fost de asemenea membri în personalul MIT, dar salariile le-ar fi fost vărsate de Institut; personalul MIT ar fi crescut astfel cu 20 de membri, fără fondur corespunzătoare. Cei care s-au opus acestui proiect au subliniat că MIT nu ar fi exercitat nici un control asupra recrutării unei părți a personalului său și nici asupra orientării cercetărilor planificate, care erau de resortul direcției institutului. Departamentul de biologie al MIT era interesat, în special, dat

fiind că angajările efectuate de „Whitehead Institute" reprezentau circa o treime din personalul departamentului (Yanchinski, 1981).

La 14 mai 1981 a fost semnat un acord între puternica firmă farmaceutică germană „Hoechst AG" și „Massachusetts General Hospital" (MGH), privind crearea, în cadrul acestuia din urmă, a unui serviciu de biologie moleculară. Afiliat școlii de medicină de la Universitatea Harvard, spitalul se administrează independent, după regulamente proprii. Hoechst trebuia să verse în conul MGH 70 de milioane de dolari pe o perioadă de 10 ani. În octombrie 1980 au avut loc, din inițiativa lui Goodman, primele contacte cu firma germană. Goodman specialist în biologia moleculară, ale cărui cercetări vizau purificarea endonucleazelor de restricție, reușise în 1977 să cloneze gena insulinei la Universitatea din San Francisco, California, în colaborare cu Rutter. Goodman s-a preocupat de asemenea de clonajul genei hormonului de creștere și de antigenul *Australia* al virusului hepatitei B (Culliton, 1982 a). Responsabilii firmei Hoechst — care estimau că deceniul 1980 — 1990 va fi marcat de importante descoperiri în biologie — se arătau favorabili dezvoltării colaborării cu laboratoarele de cercetare fundamentală.

Negocierile dintre cei doi parteneri trebuiau să ajungă la un compromis privind păstrarea libertății de cercetare în cadrul unei instituții universitare și dorința firmei industriale de a profita la maximum de investiția în dezvoltarea cercetării. Acesta este și motivul pentru care domeniile alese au fost tocmai cele care promiteau cel mai mult la începutul anilor '80: reglajul funcționării genelor din celulele organismelor eucariote, genetica celulelor somatice și a microorganismelor, virusologia, imunologia și biologia moleculară a plantelor.

Conform contractului încheiat, Hoechst se angaja să aloce 3,6 milioane de dolari în 1982 și în 1983 pentru programele de cercetare și apoi șase milioane de dolari pe ani în perioada 1984 — 1990. În plus, între 1983 — 1984 trebuiau angajați încă o sută de specialiști la spitalul american, în vreme ce o pătrime, cel puțin, din personalul companiei Hoechst trebuia să fie pregătit la MGH. În ce privește publicarea rezultatelor științifice, cercetătorii serviciului de biologie moleculară ai MGH trebuiau să își prezinte lucrările responsabililor de la Hoechst, pentru a permite acestora să examineze posibilitatea de brevetare a anumitor rezultate; după 30 de zile de la predare, consacrate acestei examinări, cercetătorii aveau dreptul să-și publice rezultatele după propria lor dorință. Conform termenilor contractuali, MGH era unicul deținător al oricărui brevet rezultat din cercetările subvenționate de Hoechst, dar firma germană își rezerva dreptul exclusiv de exploatare comercială a brevetelor; în acest caz, la totalul drepturilor de inventator vărsate în contul lui MGH trebuia luată în considerație contribuția esențială a companiei în realizarea cercetărilor. Acordul putea fi reînnoit după 1990 pentru perioade de cîte 5 ani, însă angajamentul firmei farmaceutice nu era asigurat la această dată.

Direcția noului serviciu de biologie moleculară era asigurată de Goodman, care a fost numit și profesor la departamentul de genetică al Universității Harvard. Obligațiile sale de profesor și cercetător nu erau judecate drept incompatibile cu directoratul unui departament la MGH. Sarcina lui Goodman era să dezvolte colaborarea strînsă cu un alt cercetător de la departamentul de genetică al Universității Harvard — Leder — imunolog de talent, care realizase un acord de cooperare cu firma DuPont, pre-

văzînd vărsarea de către aceasta în contul universității a șase milioane de dolari (Culliton, 1982 a).

Acordul Hoechst—MGH a fost criticat de un membru al Camerei Reprezentanților din Congresul American, Albert Gore Jr. (democrat, statul Tennessee), președinte al sub-comitetului de anchetă și supraveghere („Investigation and Oversight Subcommittee") din cadrul Comitetului Camerei pentru Știință și Tehnologie. Acest Comitet ceruse lui „General Accounting Office" al S.U.A. efectuarea unei analize juridice a acordului astfel încît să se obțină asigurarea că firma farmaceutică germană nu va beneficia în exclusiv de exploatarea rezultatelor științifice subvenționate de asemenea de „National Institute of Health". După ce membrului Congresului i-a fost remisă, în octombrie 1981, o copie a acordului în discuție, cei doi parteneri au făcut public conținutul acestuia, în decembrie același an, în același timp publicîndu-se și concluzia anchetei efectuate de „General Accounting Office". Această analiză confirma că acordul nu era în contradicție cu legile federale în privința brevetelor, cu condiția ca termenele contractului să fie respecpectate cu strictețe, și anume: a proceda în așa fel încît fondurile provenite de la guvernul federal să nu poată subvenționa cercetări ale căror rezultate și beneficii să revină firmei Hoechst. Pentru aceasta, responsabililor MGH li se recomanda stăruitor ținerea unei contabilități separate, spre a indica cu precizie originea fondurilor utilizate. Aceasta era, se pare, intenția lui MGH. Criticile congresmenului Gore nu au avut ecou în cercurile academice, unde cooperarea internațională în materie științifică era demult un lucru curent (Culliton 1982 a).

Acordul Hoechst—MGH a fost considerat, prin natura și importanța sa, drept un contract cu totul special, fiind examinat îndeaproape de alte companii și universități, ca și de personalul din facultăți, care îl studia ca pe un model eventual adoptabil. Era vorba, în opinia celor două părți contractante, de o experiență de cel mai mare interes.

La 8 iunie 1981, „Salk Institute" din La Jolla, California, și compania „Philips Petroleum" din Oklahoma au anunțat crearea lui „Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates Inc." în care compania petrolieră investea 10 milioane de dolari. Institutul nou creat era consacrat aplicării cercetărilor biologice în industria agro-alimentară, în industria chimică și petrolieră.

Mai multe universități americane au urmat exemplul oferit de Harvard, preferînd acorduri tradiționale de cooperare cu firme particulare, în vreme ce altele, precum Universitatea Michigan, Universitatea Rockfeller și California Institute of Technology căutau cu tenacitate surse de finanțare din industrie.

La Universitatea Columbia, Goldenberger, șeful departamentului de microbiologie, a propus crearea unei unități de cercetare pusă în slujba industriei. O facultate de medicină a adoptat o atare propunere și a reușit să convingă un consorțiu industrial să-i aloce 15 milioane de dolari pentru crearea de instalații specializate în cercetări de genetică (tehnica hibridomilor pentru prepararea de anticorpi monoclonali, sinteza oligonucleotidelor, disecția și clonarea genelor). Universitatea trebuia să aleagă proiectele și să le realizeze în timp ce consorțiul deținea prioritatea în exploatarea oricărei descoperiri demne de interes. Yamato, de la Universitatea din California — San Francisco, era de părere că acestă formulă putea să-i con-

vină și universității sale, care suferea de pe urma exodului de competențe, datorită vecinătății cu Genentech (Yanchinski, 1981). Alte instituții n-au ezitat să se apropie de lumea finanțelor, chiar dacă nu păreau dispuse să-și creeze un organism pentru exploatarea rezultatelor cercetărilor proprii. Era cazul lui „Cold Spring Harbor Laboratory", al lui „Salk Institute" și al Universității Berkeley, California.

Universitatea Stanford nu conta numai pe fondurile procurate din drepturile de inventar datorate brevetului Cohen și Boyer (v. pag. 254). De fapt, un inginer chimist de la această universitate, profesorul Channing Robertson, reușise să convingă șase companii („Bendix", „Elf-Aquitane", „General Foods", „Koppers", „Mead Maclaren Power" și „Paper", filiala companiei canadiene „Noranda Mines") să aloce 7,5 milioane de dolari cercetărilor aplicate, efectuate timp de 4 ani de o firmă nouă, „Engenics", situată în La Jolla, California (Yanchinski, 1981). Robertson afirma, pe drept cuvînt, că geniul biologic fusese orientat mai mult înspre aspectele biochimice și microbiologice, în defavoarea procedeelor tehnologice. „Engenics" trebuia, deci, să-și consacre activitatea dezvoltării tehnicilor de producție pe scară largă. Firma alocase 2,4 milioane de dolari în contul lui „Center for Biotechnology Research" (instituție non-lucrativă) cu scopul de a susține cercetarea fundamentală la universitățile Stanford și Berkeley (acestea primiseră circa 1 milion de dolari pentru patru ani) și în alte instituții academice. Centrul de cercetări biotehnologice deținea 30% din acțiunile lui „Engenics", a căror sporire îi putea procura venituri suplimentare; el își consacra activitatea perfecționării procedeelor de fabricație chimică, a căror dezvoltare îi revenea apoi lui „Engenics" (Yanchinski, 1981).

Acordul de cooperare anunțat la 3 iunie 1982 între compania „Monsanto" și Universitatea Washington, la Saint-Louis, Missouri, privea alocarea a 23,5 milioane dolari, în cinci ani, cercetărilor universitare (Culliton, 1982 b). Era al doilea acord de acest gen încheiat de universitate cu industria chimică în decursul a numai nouă luni. În septembrie 1981, firma „Malinckrodt Inc.", tot din St. Louis, se decisese să investească 3,9 milioane în contul Universității Washington, pentru anticorpi monoclonali.

Contractul încheiat cu „Monsanto" — pentru care fuseseră necesari trei ani de negocieri și care apelase la contribuția a 15—18 cercetători universitari — era unul din cele mai importante contracte în domeniu, semnate pînă atunci. Două erau caracteristicile sale: în primul rînd, era vorba de un acord stabilit de la instituție la instituție și care trebuia să evite atribuirea de fonduri la unul sau doi cercetători cunoscuți și aleși de compania interesată; un comitet consultativ compus din patru oameni de știință aparținînd fiecărei instituții era însărcinat să aloce fondurile membrilor facultății de medicină a universității, în funcție de cererile acestora; în al doilea rînd, colaborarea dintre cercetătorii celor două instituții urma să fie, după caz, lărgită sau redusă, în măsura în care mai mulți specialiști, cîteva zeci, de la „„Monsanto" urmau să lucreze în laboratoarele universitare, situate foarte aproape de sediul companiei.

Colaborarea științifică privea în special peptidele și proteinele, care determină o modificare în comportamentul celular, putîndu-și afla aplicații în domeniul medical. Elucidarea mecanismelor de acțiune ale peptidelor este într-adevăr, strîns legată de apariția unor boli precum artrita și hipertensiunea, ca și cu disfuncționalitatea de natură imunologică sau tumorală.

În primul an al aplicării acordului, trei milioane de dolari urmau să fie alocaţi cercetătorilor din cadrul a şase departamente (biochimie, imunologie şi microbiologie, genetică, medicină, patologie şi farmacologie) ale căror cereri financiare trebuiau să treacă mai întîi printr-un sever examen critic al comitetului de selecţie.

Eventualele brevete aparţineau universităţii, dar exploatarea lor comercială revenea lui „Monsanto"; drepturi exclusive de exploatare nu îi erau conferite societăţii decît pentru invenţiile care beneficiaseră de fondurile alocate de aceasta. În cazul în care medicamentele sau noile metode de diagnostic intrau în reţeaua comercială, veniturile se vărsau în contul facultăţii de medicină şi serviciilor aferente.

Publicarea rezultatelor obţinute trebuia supusă în prealabil unui examen al companiei, spre a stabili eventualele aplicaţii ce ar putea fi brevetate; în acest caz, publicarea într-una din revistele de specialitate putea fi amînată cu cel puţin o lună. O astfel de măsură era sistematic înscrisă în contractele de acest tip, în ciuda reticenţelor manifestate de oamenii de ştiinţă.

Acordul încheiat între „Monsanto" şi Universitatea Washington ca şi cel dintre „Hoechst AG" şi „Massachusetts General Hospital", alături de altele de acelaşi gen, au provocat teama că alocaţiile acordate de guvernul S.U.A. instituţiilor universitare vor fi, în consecinţă, serios diminuate (Culliton, 1982 b). Atît cercetătorii cît şi autorităţile universitare au subliniat faptul că tot sistemul colaborării dintre universitate şi industrie nu se poate în nici un caz substitui ajutorului esenţial acordat de instituţiile federale, ci numai că acest sistem reprezintă un supliment util şi chiar necesar, în unele cazuri.

În ce priveşte cercetarea agronomică, se constata şi aici o tendinţă asemănătoare celei care caracteriza relaţiile dintre industrie şi cercetarea ştiinţifică din chimie, genetică, biologie moleculară şi celulară. Într-adevăr, o dată cu crearea şi extinderea activităţilor companiilor petroliere şi farmaceutice, ca şi a celor de inginerie genetică, şi în sectorul biotehnologiilor agricole, facultăţile şi şcolile de agronomie erau, la rîndul lor, solicitate din ce în ce mai mult de către companiile interesate şi mulţi specialişti îşi împărţeau timpul de lucru între cele două tipuri de instituţii.

În februarie 1981, una din cele mai cunoscute societăţi de investiţie din Wall Street („E. F. Hutton") a pregătit un proiect în vederea adunării de fonduri investibile, destinate cercetării ştiinţifice, sub egida unei companii denumite „DNA Science". Proiectul se axa în esenţă pe un mai vechi acord încheiat cu Institutul Weizmann din Israel, cuprinzînd mai multe programe de cercetare (Dickson, 1981 a). În august 1981, acest proiect fusese abandonat — în forma sa iniţială, foarte ambiţioasă — însă erau în perspectivă alte proiecte, cu „Battelle Memorial Institute" din Columbus (Ohio), pentru cercetări privind degradarea cu ajutorul microorganismelor a deşeurilor toxice, ca şi cu Universitatea din San Francisco (California). „DNA Science" intenţiona să regrupeze programele de cercetare în cîteva ansambluri de dimensiuni ceva mai rezonabile, urmînd ca acestea să fie finanţate de acţionarii săi. Această schimbare de optică a oferit prioritatea acelor programe cu scop comercial bine definit, în defavoarea proiectelor pe termen lung. Operaţia se întemeia pe observaţia că, în Statele Unite, sectorul particular se interesa din ce în ce mai mult de cercetările biologice: unul dintre

responsabilii companiei „DNA Science" era de părere ca în 1985 sectorul particular va investi în cercetarea biomedicală tot atît cît „National Institute of Health" (NIH). Se beneficia, de altminteri, şi de o nouă reglementare fiscală, ce oferea unele avantaje celor care investeau în cercetarea biotehnologică.

Proiectul propus de „DNA Science" era un exemplu de colaborare între universitate şi industrie, vizînd promovarea cercetărilor asupra recombinărilor genetice. Compania urma să-şi creeze mici filiale în vecinătatea campus-urilor universitare, spre a oferi specialiştilor loc de muncă asupra unor probleme de cercetare şi pentru a păstra intactă legătura cu propriile laboratoare. „DNA Science" se obliga totodată să comercializeze rezultatele inovaţiilor biotehnologice (Dickson, 1981 a).

În Marea Britanie, serviciul creat la finele lunii octombrie 1981 de către „Science and Engineering Research Council" (SERC), în vederea promovării colaborării dintre industrie şi unităţile de cercetare ştiinţifică universitară, susţinea lucrările de doctorat pe teme interesînd companiile industriale, ca şi cooperarea acestora din urmă cu laboratoarele universitare („Co-operative Awards in Science and Engineering", (CASE). SERC încuraja mai cu seamă cercetările în colaborare efectuate asupra tehnicilor de fermentare, de utilizare a enzimelor şi a celulelor imobilizate, tehnicile de separare şi concentrare a substanţelor şi recombinările genetice. Noul serviciu al SERC avea obligaţia să colaboreze direct cu Departamentul Industriei — care putea să finanţeze proiectele ajunse în stadiul final — ca şi cu „Agricultural Research Council" şi „Medical Research Council", în mod special interesate în biotehnologii.

În 1981, acest serviciu creat de SERC dispunea de un buget anual de un milion de lire pentru biotehnologii (din care o treime pentru cercetările aplicate şi două treimi pentru cercetarea fundamentală). Pentru 1984 —85 se prevedea o cifră de 2,4 milioane de lire. Douăsprezece societăţi particulare — între care „Beecham", „Glaxo", „Shell U.K.", „Unilever" şi „Wellcome" — participau la eforturile guvernamentale: fondurile alocate în acest sens lui SERC în 1982 urmau să fie dublate în 1984.

Înfiinţarea unui centru de biotehnologii în Scoţia, la Glasgow, în asociaţie cu universităţile din acest oraş şi din Stratchlyde, avea drept scop dezvoltarea relaţiilor dintre industrie şi universitate şi exploatarea pe plan comercial a descoperirilor făcute de cercetarea ştiinţifică scoţiană. Guvernul furniza circa 22% din totalul investiţiilor, în valoare aproximativă de 14 milioane lire sterline. Cercetările întreprinse la Universitatea din Glasgow erau finanţate de „Medical Research Council" şi de industria particulară; ele priveau domeniul virusologiei, al cancerologiei, al recombinărilor genetice şi al biochimiei. Universitatea din Strathclyde urma să contribuie la cercetarea ştiinţifică şi tehnică de microbiologie generală şi aplicată.

Dezvoltarea cooperării dintre universitate şi industrie în domeniul biotehnologiilor se explică în parte şi prin restricţiile bugetare operate de guvernul Marii Britanii la capitolul învăţămînt superior.

Colegiul Imperial al Universităţii din Londra a înfiinţat, împreună cu o filială a lui „Finance for Industry Group" şi cu „Technical Development Capital Ltd.", o nouă societate de biotehnologie, „Imperial Biotechnology Ltd.", care utiliza laboratoarele universitare şi în special unitatea pilot de fermentare (capacitatea fermentatoarelor: de la 3 la 5 000 litri) pentru fa-

bricarea de enzime, proteine și de alte produse destinate industriei chimice și farmaceutice. Pe plan financiar, înființarea acestei societăți privea în mod egal pe cei doi parteneri. Ea facilita, între altele, găsirea unei soluții la dificultățile financiare întîmpinate de „Imperial College" în privința cheltuielilor necesitate de echipamentul de întreținere a acestei unități de fermentare, parte componentă a departamentului pentru biochimie. Noua societate trebuia să ajungă la autofinanțare și la o cifră de afaceri de cîteva milioane de lire anual. Pe planul personalului, 20 de cercetători de la unitatea de fermentație reveneau în sarcina noii societăți, păstrîndu-și obligațiile din învățămînt și cercetare; creditele astfel dobîndite trebuiau să permită angajarea altor specialiști la Centrul de Biotehnologie, aflat în curs de inființare sub conducerea profesorului Hartley, care era în același timp consilier științific la „Imperial Biotechnology Ltd."

„University College" obținuse, în 1982, șapte milioane de dolari de la firma farmaceutică elvețiană „Sandoz", pentru a sprijini un proiect de cercetare biochimică a creierului, cu scop de aplicare terapeutică. În aceeași perioadă, contractul încheiat între departamentul de biochimie de la „University College" și societatea americană „Endorphin Inc." din Seattle, urma să aducă instituției universitare 410 000 dolari, bugetul de funcționare al Colegiului fiind sever redus. Acest contract prevedea sinteza endorfinei pancreatice cu ajutorul bacteriilor, prin clonarea genei responsabile a sintezei respective. Sinteza era într-adevăr o operație dificilă, iar producerea ei prin intermediul bacteriilor permitea obținerea de cantități suficiente încercărilor de a demonstra că endorfina pancreatică poate ajunge la creier (spre deosebire de alte endorfine) sub o formă activă, atunci cînd este administrată intravenos. În acest mod proiectul nu avea numai rolul să contribuie la rezolvarea dificultăților financiare ale departamentului de biochimie și genetică de la „University College", dar și să producă dovezi substanțiale ale proprietăților terapeutice ale acestui hormon, permițînd producerea sa pe scară largă.

La nivel european, asociația de „Știință, industrie și tehnologie pentru Europa", creată în 1981 la inițiativa fundației Mérieux și a Asociației Pasteur — Weizmann, își propunea să contribuie la stabilirea unor noi raporturi între știință și industrie. Asociația luase inițiativa organizării celui de-al doilea Congres Internațional dedicat transferului de embrioni la mamifere. Congresul a avut loc, între 20—22 septembrie 1982, la Annecy, în Haute Savoie, și a reunit 300 de cercetători din 35 de țări. Următoarele reuniuni organizate de Asociație aveau ca obiect inteligența artificială și industria viitorului sau rolul biotehnologiilor față de fenomenul malnutriției în Lumea a Treia.

În general și pentru mulți specialiști, problemele ridicate de raporturile dintre bioindustrie și universitate păreau depășite, de vreme ce formele de cooperare între instituțiile universitare și cele industriale erau deja un fapt incontestabil. Este și motivul pentru care unii oameni de știință nu au ezitat să propună reguli noi de colaborare, ca de pildă: dacă, în cadrul aceleiași instituții, schimbul de material biologic este liber, atunci cînd este vorba de mai multe instituții este nevoie de acorduri reciproce; fiecare schimb de material, fiecare expediere va avea nevoie de confirmări de primire; orice aplicare comercială a rezultatelor provenite din cercetarea fundamentală presupune imperios vărsări de fonduri sub forma compensațiilor și a unor

procente din venituri. Pare, aşadar, din ce în ce mai clar că oamenii de ştiinţă trebuie să ia ei singuri iniţiativa elaborării unor noi forme de conlucrare cu sistemul industrial. Aşa stînd lucrurile, va fi mult mai uşor să se înţeleagă natura dificultăţilor şi a inconvenientelor, după cum mai uşoară va fi adoptarea măsurilor corective ce se impun. Starlinger, genetician la Universitatea din Cologne, afirma chiar că specialiştii în genetică vor trebui să facă faţă unui şoc de natură sociologică; în măsura în care punerea la punct a unui produs nou costă între 10 şi 100 milioane de dolari, cercetătorii universitari cu acces la astfel de credite, vor deţine, prin urmare, o putere considerabilă; un decalaj cu totul special îi va separa, atunci, pe cercetătorii care dispun de atari fonduri, de cei „mai săraci", realitate care va afecta relativa democraţie existentă în cadrul cercetării ştiinţifice fundamentale (Yanchinski, 1981).

Toate aceste probleme, ca şi încercarea de a defini un cadru nou de colaborare între universitate şi industrie au constituit tema unui seminar organizat, în martie 1982, la Pajaro Dunes, în California, şi care a reunit preşedinţi şi membri ai corpului profesoral de la cinci mari instituţii universitare americane (universităţile Harvard, din California şi Stanford, „Massachusetts Institute of Technology" şi „California Institute of Technology"), alături de directorii a zece importante societăţi de biotehnologie (precum „Applied Biosystems Inc.", „Beckman Instruments", „Cetus Corporation", „DuPont", „Eli Lilly", „Genentech", „Gilette Corporation" şi „Syntex"). Conform declaraţiei făcute de preşedintele Universităţii Stanford, unul din organizatorii acestei reuniuni, rostul întîlnirii era de a elabora un cadru al viitoarelor relaţii dintre universităţi şi industrie.

Declaraţia redactată la sfîrşitul reuniunii sublinia necesitatea dezvoltării acestor relaţii, de ambele părţi, arătînd totodată că raporturile profesionale cu societăţile comerciale nu trebuie să interfereze cu obligaţiile curente ale sistemului de învăţămînt şi cercetare. Mai mult, nu este oportun ca universităţile să aibă interese în cadrul societăţilor al căror personal aparţine acestor universităţi. Ambele părţi s-au declarat de acord asupra faptului că toate contractele de cercetare trebuie înconjurate de cel mai strict secret şi că oamenii de ştiinţă din universităţi, lucrînd pe baza fondurilor provenite din industrie, trebuie să-şi păstreze deplina libertate în a-şi face publice rezultatele muncii. Participanţii la seminarul de la Pajaro Dunes s-au arătat favorabili redactării de către universităţi a unor regulamente explicite, privind conflictele de interese ocazionate de atari forme de cooperare. Ei au afirmat, de asemenea, că toate contractele de cercetare încheiate de universităţi cu societăţile particulare nu trebuie să atenteze la sistemul curent de pregătire a studenţilor, la libera alegere a temelor sau subiectelor de cercetare şi nici să deturneze personalul facultăţilor de la obligaţiile lor fundamentale, pe linie de învăţămînt şi cercetare.

În schimb, participanţii la seminar şi-au împărţit opiniile, atunci cînd a fost vorba de beneficii, de companiile industriale ce finanţează cercetarea în universităţi şi de dreptul exclusiv de a utiliza rezultatele cercetărilor. Unii participanţi au arătat că o astfel de dispoziţie este excesivă şi că — dispensînd compania interesată de plata drepturilor de exploatare — rezultatele cercetărilor şi brevetele corespunzătoare pot fi negociate cu alţi parteneri. Alţi participanţi au remarcat, dimpotrivă, că non-exclusivitatea în

manevrarea beneficiilor va avea drept efect descurajarea companiilor particulare în ce privește preluarea riscurilor inerente comercializării oricărui nou produs și că acest fapt va micșora interesul lor față de cercetarea fundamentală (Dickson, 1982 c).

Brevete și exploatarea invențiilor

Ca și în cazul celorlalte domenii ale inovației tehnologice, obținerea de brevete reprezintă un mijloc de protejare a invențiilor din biotehnologie și le conferă legitimitatea de rigoare. Aceasta este și o garanție pentru cei care investesc capital și încredere în dezvoltarea bioindustriei. Este și motivul pentru care, pînă în iunie 1980, la biroul american al brevetelor („U .S. Patent and Trademark Office") au fost depuse o sută de cereri de brevete.

La 16 iunie 1980, Curtea Supremă a S.U.A. a confirmat — prin 5 voturi pentru și unul contra — verdictul unui tribunal care obliga „U. S. Patent and Trademark Office" să-i acorde lui Ananda Chakrabarty (de la „General Electric Company", GEC) brevetul pentru crearea unei bacterii din genul *Pseudomonas*, capabilă să descompună petrolul brut, foarte eficace în lupta contra mareelor negre. Cercetătorul depusese cererea de brevet în 1972. Chiar dacă Curtea Supremă a rezervat Congresului American dreptul de a-i anula decizia și de a interzice drepturile de brevet pentru obținerea unor organisme vii, dacă ar fi considerat necesar, o astfel de decizie ridica, oricum, un obstacol important în fața cercetărilor de laborator și a exploatării sale bioindustriale. Pe de altă parte, decizia însemna o recunoaștere de netăgăduit a progreselor rapide realizate în biotehnologie, în ciuda faptului că bacteria izolată de Chakrabarty nu era rezultatul aplicării tehnicilor de recombinare a ADN-ului, ci al unor tehnici bacteriologice clasice. Unii conducători de firme biotehnologice au văzut în această decizie justă un argument în favoarea dreptului de brevetare pentru alte descoperiri genetice analoage, în vreme ce alți factori responsabili din sistemul cercetării fundamentale al S.U.A. opinau că luarea unui brevet spulbera secretul cu care, din ce în ce mai stăruitor, erau înconjurate investigațiile genetice făcute în laboratoare.

Oricum, brevetul depus de Stanley Cohen, de la Facultatea de Medicină a Universității Stanford și de Herbert Boyer, de la Universitatea din San Francisco California — ambii considerați pionieri ai geneticii a fost omologat la 2 decembrie 1980 sub nr. 4237224. Acest brevet a fost depus la 4 ianuarie 1980 și înlocuia, în parte, alte trei cereri făcute în 1974, 1976 și 1978 (Dickson, 1980 a, e, f). Brevetul privea tehnicile de replicare a genelor exogene în microorganisme și, în particular, utilizarea plasmidelor (ADN viral) ca elemente de replicare, în care sînt inserate gene străine a căror expresie este dorită. Brevetul preciza că această metodă reprezintă un mijloc comod și eficace pentru introducerea în microorganisme a informației genetice indispensabile pentru producerea acizilor nucleici și a proteinelor, cum sînt unele enzime cu importanță pe plan medical sau comercial. Lista aplicațiilor, oferită o dată cu cererea de brevet, cuprindea producerea de substanțe medicamentoase,

fixarea azotului atmosferic, fermentațiile, utilizarea și transformarea substanțelor alimentare specifice. Brevetul proteja cele trei etape ale sintezei plasmidelor recombinate, utilizarea lor în transformarea bâcteriilor, precum și replicarea și transcripția lor în cuprinsul acestora. Bacteriile erau menționate ca fiind organismele unicelulare cel mai lesne de manipulat, în timp ce plasmidele utilizabile au o greutate moleculară cuprinsă între 1 și cincizeci milioane daltoni. Plasmida pSC101 (sintetizată de Cohen și colab. în 1972) era semnalată ca exemplu de plasmidă folosită în experiențele de clonare. Tehnicile de clivaj al ADN-ului plasmidei, apoi unirea acestei plasmide cu alte fragmente de ADN erau, și ele, descrise. Clonarea genelor multiple era de asemenea indicată, iar importanța producerii de hormoni peptidici era subliniată în cazul hormonului paratiroidian, a hormonului de creștere, a gonadotropinei, a insulinei, a ACTH, a somatostatinei și prolactinei. Brevetul nu părea să acopere, totuși, utilizarea altor vectori decît plasmidele pentru clonarea ADN, astfel încît tehnicile genetice vizînd intervenția virusurilor cultivate pe celule animale nu erau prevăzute în brevet. Același era cazul vectorilor capabili să asigure transferul între celulele eucariote și procariote. Însă levurile erau totuși menționate.

În august 1981, Universitatea Stanford a precizat condițiile de utilizare a acestor tehnici pentru toate laboratoarele interesate. Cercetătorii din universități aveau acces gratuit, în timp ce companiile care ar fi dorit să comercializeze substanțe sau produse fabricate cu ajutorul acestor tehnici trebuiau să achite drepturi cuprinse între 1% (pentru un produs net al vînzărilor situat sub 5 milioane de dolari) și 0,5% (pentru un produs al vînzărilor de peste 10 milioane dolari). Fiecare companie care ar fi dorit să utilizeze tehnicile în discuție putea să dobîndească, înainte de trecerea în stadiul comercial, o autorizație non-exclusivă din partea universității, vărsînd un drept inițial de 10 000 dolari și un drept anual de aceeași valoare. După extragerea a 15% din veniturile astfel obținute, Universitatea Stanford trebuia să repartizeze în mod egal fondurile acumulate, una din două părți revenind universității californiene. Partea rezervată Universității Stanford se împărțea egal între facultatea de medicină, departamentele de genetică și medicină și Stanley Cohen. Acesta din urmă își cedase, de altminteri, drepturile universității, spre a subvenționa cercetări biomedicale și de a oferi burse post-doctorat. La fel procedase Herbert Boyer, cedîndu-și drepturile bănești universității (Dickson, 1981 b, c).

Universitatea Stanford — care avea un buget anual de peste 100 milioane dolari, fiind una dintre cele mai importante universități americane în domeniul cercetării, nu a beneficiat, totuși, de venituri prea însemnate din exploatarea brevetelor. Brevetul Cohen — Boyer raporta, însă, conform declarațiilor universității, mai bine de un milion dolari pe an, în perioada 1981—1985. Brevetul conținea, ce-i drept, un spectru larg de protecție asupra tehnicilor utilizate în numeroase laboratoare. În august 1981, universitatea a evaluat la peste două sute numărul companiilor din S.U.A. care utilizau aceste tehnici. Numai că, fiind vorba de un brevet care proteja tehnicile și procesul de fabricație dar nu produsele, utilizatorii puteau oricînd obiecta că au introdus modificări ușoare pentru a nu mai fi obligați să plătească procentele cuvenite.

Universitatea Stanford stipulase de asemenea că orice companie ce a primit un permis de exploatare a brevetului trebuia să se supună regulilor

privind experienţele de genetică stabilite de „National Institute of Health". Între altele, Universitatea salutase cu satisfacţie măsura luată de „International Trade Commission" pentru interzicerea importurilor de produse fabricate fără permis de exploatare în afara graniţelor S.U.A., dar pe baza tehnicilor brevetate în această ţară. Era, într-adevăr, de aşteptat ca unele companii care urmăreau să evite plata taxelor de achiziţie şi procentele revenite din exploatare, să instaleze unităţi în afara graniţelor S.U.A. De altfel, însă, mai multe companii erau gata să accepte condiţiile impuse de Universitatea Stanford, pe care le considerau justificate. Concret, era vorba de „Cetus" şi „Genentech". La finele lunii februarie, 1982, responsabilul lui „Office of Technology Licensing" al Universităţii Stanford a făcut cunoscut că 73 de companii acceptaseră să plătească taxa anuală de 10 000 dolari. Firmele europene păreau să opteze pentru aceeaşi atitudine a firmelor americane, în măsura în care piaţa americană le interesa în mare măsură, iar neplata drepturilor risca să împiedice exportarea produselor lor în Statele Unite (Dickson, 1981 b, c, 1982 a).

Două universităţi, Stanford şi San Francisco, depuseseră deopotrivă la „U. S. Patent and Trademark Office" o altă cerere de brevet, în numele lui Cohen şi Boyer, pentru a-şi asigura drepturile asupra microorganismelor modificate pe baza tehnicilor brevetate. Era vorba acum nu numai de tehnicile de recombinare genetică, dar şi de produsele rezultate din utilizarea acestora, respectiv noile microorganisme cu genom modificat. Pentru a face o atare contestaţie pe plan legal, universităţile trebuiau să se afle pe o poziţie foarte solidă. Cea de-a doua cerere se referea la orice plasmidă recombinată cu ajutorul tehnicilor puse la punct de Cohen şi Boyer, în măsura în care transferul plasmidei era compatibil cu organismul-gazdă. Se specifica faptul că numai celulele de bacterii sau protozoare (nu şi cele animale sau vegetale) erau afectate de procesul de transformare prevăzut în brevet.

Aprobarea acestui al doilea brevet a fost amînată pînă la 30 iunie 1982 el trebuind să fie făcut public de către „U. S. Patent and Trademark Office" la 13 iulie 1982. Universităţile Stanford şi San Francisco aveau 90 de zile la dispoziţie pentru a respinge obiecţiile Biroului American al Brevetelor (Budianski, 1982). Unii experţi estimau că, în caz de refuz definitiv, aprobarea primului brevet putea fi ea însăşi pusă în discuţie şi că, în consecinţă, va urma aplicarea de penalităţi, nu numai pentru cele două universităţi dar şi pentru cele 73 de companii care, în 1982, acceptaseră principiul achitării de drepturi de exploatare pentru cele două brevete.

Decizia Biroului american de brevete părea să pună în discuţie originea plasmidei pSC10, utilizată de Cohen şi Boyer pentru clonarea genelor străine în celulele de *E. coli*. Cercetătorii consideraseră că plasmida provenea dintr-o plasmidă naturală denumită R6-5. Însă Biroul de brevete arăta că, într-un articol publicat de Cohen şi Chang în 1977, erau indicate alte origini posibile, semnalînd în special o înrudire posibilă cu plasmida SP219 de *Salmonella*. Conform opiniei Biroului de Brevete, concluziile acelui articol asupra originii plasmidei veneau în contradicţie cu cele indicate în cererea de brevet. Obiecţia Biroului se întemeia, de asemenea, pe faptul că, în 1977, Cohen indicase într-o scrisoare adresată directorului lui „National Institute of Health" că inserţia de ADN străin într-o plasmidă se poate face în mod natural; nu era, deci, cazul să se breveteze un proces natural. Cohen a reacţionat afirmînd că elaborarea unei plasmide nu lăsa loc nici unui dubiu, că aceasta era

integral reproductibilă şi că, prin urmare, concluziile articolului din 1977 relevau numai o ipoteză asupra originii posibile a plasmidei (Budianski, 1982). Consilierii însărcinaţi de Universitatea Stanford cu apărarea noului dosar pe lîngă Biroul de Brevete au adăugat că tehnica lui Cohen şi Boyer putea fi utilizată cu orice fel de plasmidă şi că frecvenţa proceselor de recombinare era mult redusă în condiţii naturale, pentru a prezenta un interes practic, respectiv în cazul clonării de ADN.

De cealaltă parte, conform opiniei exprimate de Albert Halluin, preşedintele lui „Chemical Practice Committee" din cadrul lui „American Patent Law Association" şi unul din autorii lucrării *The patenting of life forms* (New York, Cold Spring Harbor Laboratory, august 1982) — „reclamanţii" nu furnizaseră plasmide tuturor celor care solicitaseră acest lucru. Tot după Halluin, Cohen şi Boyer ar fi trebuit să se aştepte şase luni după depunerea dosarului cu cererea lor, înainte de a oferi copii ale plasmidei lui „American Type Culture Collection". Explicaţia dată acestei omisiuni a arătat că nu era vorba de o tulpină microbiană vie, a cărei conservare în respectiva colecţie americană să fie obligatorie, pe toată durata unui brevet.

O altă obiecţie ridicată de Biroul de Brevete privea posibila divulgare a invenţiei în noiembrie 1974 şi anume cu un an înainte de data depunerii cererii de brevetare. Într-adevăr, într-un articol publicat în numărul din 25 octombrie 1973 în revista *New scientist* din Londra, un cercetător american, Edward Ziff, care lucra la „Molecular Research Laboratory" din Cambridge, descrisese în detaliu reacţiile enzimatice care le-au permis lui Cohen şi Boyer să-şi finalizeze experienţele. Acest articol urma unui seminar („Gordon Research Conference"), organizat în 1973 la New Hampshire, şi în cadrul căruia Boyer expusese sutelor de participanţi tehnicile de elaborare a ADN-ului recombinat (v. *New scientist*, 1982).

În sfîrşit, Biroul de Brevete dorea să ştie dacă nu cumva Robert Helling (Universitatea Michigan), care se afla în vizită la laboratorul lui Boyer şi care efectuase numeroase analize pentru identificarea fragmentelor de ADN ale plasmidei, nu trebuia considerat drept al treilea co-inventator al tehnicii în discuţie.

Indiferent de decizia finală a Biroului American de Brevete, toată această tevatură demonstrează că luarea unui brevet pentru tulpini microbiene cu genom modificat poate întîmpina greutăţi şi contestări şi că o linie precisă de conduită este dificil de găsit.

De fapt, pot fi brevetate fiinţele vii?

În Statele Unite, legea brevetelor, care nu s-a modificat deloc de la redactarea ei de către Thomas Jefferson, precizează că brevetul se poate acorda oricui inventează sau descoperă un procedeu nou şi folositor, o maşină ori un produs manufacturat. În 1930 şi în 1970, Congresul American a votat o lege care permitea acordarea de brevete pentru noi varietăţi de plante cultivate. Decizia din iunie 1980 a Curţii Supreme a S.U.A. se baza pe faptul că distincţia esenţială nu era cea dintre fiinţe vii şi obiecte neînsufleţite, ci între produse ale naturii, vii sau nu, şi invenţii făcute de om. Bacteria izolată de Chakrabarty era, după opinia majorităţii membrilor Curţii Supreme,

rezultatul ingeniozității umane, un rezultat, prin urmare, brevetabil. De cealaltă parte, nu era pentru prima oară că se aproba brevetarea unei bacterii sau a unei ființe vii. Pasteur brevetase în 1873 o tulpină de drojdie de bere. Tot așa, dacă s-ar fi făcut din ființele vii o categorie aparte, ar fi trebuit refuzată brevetarea, în 1818, a sintezei ureei realizată de Wohler și, în consecință, toată chimia organică ar trebui exclusă din domeniul invențiilor brevetabile (Dickson, 1981 b).

Dar critica la decizia Curții Supreme se explica prin temerile privind o aplicare comercială prea rapidă a tehnicilor de recombinare genetică, inevitabil favorizată de brevetarea microorganismelor obținute prin aceste tehnici. Unii se întrebau dacă nu se anticipa astfel acea „brave new world" profetizată de Aldous Huxley, o lume în care laboratoarele ar deține monopolul manevrării vieții ca atare, sub protecția justiției. Alții afirmau că decizia Curții Supreme sfida pur și simplu diferența dintre viu și non-viu, reducînd viața la o sumă de procese fizico-chimice. Totuși, încă din 1946 Schrödinger (premiul Nobel pentru fizică) subliniase caracterul cu totul aparte al materialului biologic față de toate celelalte stări ale materiei, iar progresele spectaculoase ale biologiei moleculare și proprietățile de transmitere a informației prin sisteme genetice au confirmat încă o dată caracteristicile particulare ale ființelor vii. După Morowitz, profesor de biofizică moleculară și de biochimie la Universitatea Yale, aprobarea acestui brevet ridica probleme de ordin filozofic, riscînd să șocheze credințele unui mare număr de cetățeni americani, pe plan umanitar și teologic.

Oricum ar fi, „U. S. Patent and Trademark Office" își exprima neliniștea în ce privește consecințele aprobării date de Curtea Supremă: cum pot fi caracterizate aceste microorganisme? Prin condițiile de cultură, prin activitatea metabolică, prin produsele sintetizate? Cum trebuie considerate mutațiile naturale și artificiale care vor modifica mai mult sau mai puțin activitatea importantă din punct de vedere economic al microorganismelor? Care va fi nivelul de la care trebuie pornit pentru a se putea conchide că este vorba de un nou microb, neacoperit, deci, de un brevet? Probleme asemănătoare existau și pentru legea franceză a brevetelor, care menționa ca nefiind brevetabile: „rasele animale, ca și procedeele esențial biologice de obținere a plantelor sau animalelor, această dispoziție neaplicîndu-se procedeelor microbiologice și produselor obținute prin intermediul acestora" (legea din 2 ianuarie 1968, modificată la 13 iulie 1978). Diferența dintre „produse" — adică, materialele sintetizate cu ajutorul microorganismelor — și microbii ca atare pare oarecum academică, în măsura în care, în Franța, spre deosebire de S.U.A., invenția nu face obiectul unui examen aprofundat, ci al unei simple cercetări documentare. Oficiul de brevetare trebuie să elibereze brevetul solicitat, cu excepția cazurilor în care invenția nu este deja cunoscută. Cererile făcute se refereau în același timp la procedeul de fabricație, tulpina bacteriană și produsul sintetizat. În termenii legii franceze, primul și al treilea termen erau în mod clar brevetabile, chiar dacă microbul nu era. O astfel de situație nu era totuși scutită de dificultăți, dacă o cerere de brevet era făcută pentru același microb, dar preparat și cultivat diferit, spre a furniza un alt produs.

Legea franceză, care prevedea brevetarea anumitor plante, precum trandafirii, a eliminat încă din 1978 varietățile vegetale dintre invențiile brevetabile. Ea proteja totuși varietățile de plante, atunci cînd acestea făceau obiectul unei culturi și al unei verificări certificîndu-le noutatea; această pro-

tejare era considerată ca fiind mai puțin puternică decît cea asigurată printr-un brevet. Ea nu interzicea propriu-zis cultura la scară redusă a unei varietăți în scopul de a crea altele. În cazul aprobării de brevete pentru microorganisme, apărea riscul de a-i împiedica pe inventatori să utilizeze tulpinile ca punct de plecare pentru o nouă linie, pentru a crea alte suşe.

În fapt, legislația brevetelor a cunoscut o evoluție importantă o dată cu semnarea, în 1973, a Convenției de la München referitoare la brevetele europene. Ea a intrat în vigoare în 11 state ale Europei la 1 iunie 1978 şi mai multe țări industrializate, începînd cu Franța, şi-au adaptat propriile legi în consecință.

Articolul 53 din această lege excludea rasele animale şi varietățile plantelor de la brevetabilitate, dar nu şi produsele obținute prin procedee microbiologice. Acestea puteau fi microorganisme, în particular suşe cu patrimoniul genetic modificat prin intervenția umană.

Biroul European de Brevete va preciza la 11 decembrie 1981, că „. . . excluderea nu se aplică procedeelor microbiologice şi nici produselor obținute prin intermediul acestora". Acestea din urmă cuprindeau atît tehnicile industriale care utilizau microbi, cît şi crearea de noi suşe microbiene prin recombinarea acizilor nucleici. După De Haas (1982), această precizare şi interpretarea art. 53 din Convenția de la München confirmau că natura vie a organismului nu îl poate exclude pe acesta de la brevetare. Dacă pare cu neputință ca, prin intermediul unui brevet să fie luat în stăpînire un organism viu, de exemplu, un microorganism existent în natură şi descoperit printr-o banală investigație, în schimb, se poate admite conferirea unui brevet unui microb sau unei făpturi vii — izolate şi transformate de inventator, pentru a îndeplini un rol pe care, în condițiile naturale, acesta nu l-ar fi putut juca. Această nouă formă permite, în fapt, obținerea de rezultate interesante, fiind punctul de plecare al unei inovații; poate fi, de asemenea, vorba de un produs nou prin comparație cu produsul natural (De Haas, 1982).

Biroul pentru Brevete din Canada a adus în 1982 o semnificativă schimbare legislativă în materie de brevetare, constînd în includerea microorganismelor cu genom modificat în categoria produselor brevetabile. Schimbarea a intervenit în urma unei cereri de brevet depusă de compania de produse de papetărie „Abitibi Price", ai cărei cercetători, în colaborare cu cei de la „Western Ontario University", au reuşit să transforme cinci suşe de mucegai pentru a le face capabile să epureze lichidele sulfitate produse de uzinele firmei. Biroul Canadian de Brevete a respins la început cererea, dar, în martie 1982, după o nouă solicitare depusă la Comisia de Apel a Brevetelor, a fost luată hotărîrea de reexaminare a dosarului; nu exista, de fapt, nici o obiecție de principiu față de brevetarea unei tehnici de obținere a suşelor microbiene şi față de modificarea acesteia în scopul utilizării lor în operațiile de epurare a efluenților industriali. Experții canadieni estimau, alături de cei din alte țări industrializate (Australia, S.U.A., Japonia, R.F.G., Anglia) că o nouă atitudine față de eliberarea brevetelor va trebui să favorizeze cercetările şi aplicațiile în diferitele domenii ale biotehnologiei.

În concluzie, acordarea de brevete pentru suşe bacteriene, modificate sau nu prin tehnici de recombinare genetică, nu se poate face fără a genera probleme de ordin filozofic şi juridic. Dar, dincolo de chestiunile de principiu,

se profilează destule raţiuni de ordin economic şi practic. Deciziile luate în Statele Unite şi în alte cîteva ţări industrializate traduc în fapt refuzul de a face vreo diferenţă între un proces viu şi un obiect sau un mecanism fizic, cu toate că a breveta o fiinţă vie pentru a o utiliza într-un scop particular nu este totuna cu a breveta folosinţa ca atare. Dar, pentru unii responsabili ai firmelor bioindustriale, protecţia prin intermediul brevetelor riscă să devină mai puţin interesantă, datorită greutăţilor din calea brevetării, decît protecţia oferită de păstrarea secretului care înconjoară cercetările, precum şi de avantajele unei comercializări rapide a inovaţiilor tehnologice.

Noi perspective, noi probleme

Perspective în aplicarea descoperirilor

Întrebați asupra posibilităților de aplicare pe termen scurt a descoperirilor și a comercializării produselor rezultate din tehnicile de recombinare genetică, oamenii de știință se feresc să suscite speranțe neîntemeiate, dar și să decepționeze, preferînd să recunoască faptul că progresele rapide ale cercetării lasă să se întrevadă posibilitatea unor aplicații în viitorul imediat. În orice caz, vulgarizarea, excesivă uneori, a descoperirilor, omițînd semnalarea dificultăților și a problemelor ridicate de acestea, nu contribuie deloc la configurarea unei perspective corecte în ce privește aplicarea biotehnologiilor (Sasson, 1981).

Conform unui studiu Delphi (Stewman, Lincoln și colab., 1981), rezultate și progrese spectaculoase ale microbiologiei vor surveni între 1980 și anul 2000. Datele avansate (cu o probabilitate de 50 sau de 90%) erau, pentru aceste rezultate, următoarele: creare de noi plante fixatoare de azot (1985, 1995), proteină comestibilă din organism unicelular (1982, 1987), selecția de plante care rezistă acțiunii dăunătorilor (1990, 2000), selecția de bacterii pentru fabricarea produselor de substituție ale compușilor petrochimici (1988, 1995), terapia genei pentru corectarea maladiilor de natură genetică, precum drepanocitoza (1993, 2010), izolarea genelor răspunzătoare de anomaliile ereditare (1985, 1990), mai buna cunoaștere a procesului de senescență (1990, 2000), înțelegerea proceselor imunologice (1984, 1991). Studiul propunea totodată date aproximative privind punerea în funcțiune a unor inovații: noi plante fixatoare de azot (1990, 2000), bacterii pentru tratarea deșeurilor și pentru degradarea poluanților (1985, 1994), produse de substituție a compușilor petrochimici, de felul biopesticidelor (1985, 1995), terapie genică (2000, 2045). În agricultură și în industria farmaceutică, aplicațiile păreau mai apropiate (pentru producția de insulină, de pildă, 1983, 1984). În ciuda inconvenientelor studiilor de tip Delphi (acestea fuseseră atenuate în cazul studiului în discuție, grație consultării unui număr mare de specialiști) constatarea proximității datelor avansate era de-a dreptul șocantă. Autorii studiului considerau că, fără să anunțe descoperirea panaceului universal, cercetările ingineriei genetice erau bogate în promisiuni.

Este adevărat că în multe domenii aplicațiile sînt întru totul posibile, iar trecerea de la laborator la uzină fără nici o îndoială realizabilă. Mai multe

procedee biotehnologice, rapid perfectibile, sînt în mod deosebit interesante pentru țările în curs de dezvoltare (bioenergetica, fermentațiile, conversia deșeurilor, producția de vaccinuri). Însă, în alte domenii, cum este cel al sintezei substanțelor farmaceutice, drumul este mult mai greu, implicînd lungi și costisitoare probe de toxicitate la care trebuie supuse substanțele.

Iată pentru ce, în S.U.A., timpul necesar pentru brevetarea unui nou produs farmaceutic, și care era de trei ani la începutul anilor '60, a ajuns de șapte ani și jumătate la începutul anilor '70 și la nouă ani în 1978/79. Această evoluție se explică prin constrîngerile din ce în ce mai stricte solicitate de probele de toxicitate, probe indispensabile pentru stabilirea inocuității (lipsa elementelor contraindicate, a efectelor secundare, a proprietăților vătămătoare) produselor livrate pe piață și pentru reducerea la minimum a efectelor negative. Restricțiile intervin, de altfel, într-un moment în care descoperirea de noi medicamente este din ce în ce mai dificilă: este nevoie, într-adevăr, de a sintetiza peste șapte mii de compuși organici, în medie, înainte de izolarea unui produs farmaceutic util. În consecință, prețul lansării pe piață a unui nou produs a crescut de cinci ori între 1960 și 1975. În acest preț, care era de ordinul a 50 milioane dolari, cercetările chimice și farmacologice nu reprezentau mai mult de o treime, în timp ce două treimi erau consacrate testelor de toxicitate, verificărilor clinice și altor operații indispensabile pentru obținerea autorizației de vînzare. Numărul medicamentelor noi a scăzut, în vreme ce sumele alocate dezvoltării au crescut, în defavoarea celor investite în cercetarea propriu-zisă. Numai marile firme sînt capabile să realizeze atari operații și să ia parte activă la dezvoltarea proceselor biotehnologice în producția de substanțe farmaceutice.

Cazul interferonului ilustrează elocvent dificultățile de care se lovesc noile procedee biotehnologice, subliniind necesitatea unor încercări desfășurate în timp și cu multă rigoare, înainte de a conchide asupra eficienței terapeutice. Într-adevăr, examenul critic al probelor realizate în lume între 1980 și 1982 suscită serioase rezerve în ce privește virtuțile anticanceroase ale interferonului. Față de nerăbdarea optimistă manifestată de unii cercetători, față de speranțele date în mod neîntemeiat familiilor bolnavilor, ca și față de investițiile excesive ale industriei farmaceutice, autoritățile sanitare au reacționat cu prudență, îndemnînd la răbdare într-o luptă dominată de reacțiile pasionale ale unora și de interesele altora. Era, desigur, nevoie de mai puțin triumfalism de mai puține reclame senzaționale, și de o mai atentă și mai ponderată evaluare a faptelor (Yanchinski, 1980; Newmark, 1981 c).

Dificultățile și problemele generate de aceste testări erau de mai multe feluri. În primul rînd, costul exorbitant, explicabil datorită cantităților foarte mici produse, și care ar fi trebuit să îndemne la evitarea testării lor în cadrul unor tratamente individuale, ci dimpotrivă, la testarea la nivel internațional, singura în măsură să ofere rezultate cît de cît sigure. În 1978, întreaga rețea de laboratoare din Finlanda producea aproximativ o zecime de gram de interferon pur, adică necesarul pentru tratarea a 200 de victime ale maladiilor virale cronice. În 1980, s-a evaluat la 150 numărul bolnavilor de cancer supuși tratamentului cu interferon. Se considera în acel moment că tratamentul experimental al unui proces canceros necesita 500 milioane sau un miliard de unități de interferon, ceea ce revenea, tradus financiar, de la 20 000 la 40 000 dolari de fiecare bolnav.

În al doilea rînd, cel puțin în domeniul cancerologiei, oricare ar fi gradul de intensificare a producției de interferon și ținînd seama de caracterul adeseori negativ al rezultatelor obținute, interferonul trebuie considerat ca o substanță experimentală, a cărei utilizare nu poate fi permisă decît în cadrul clinicilor specializate. Nu este vorba de un medicament obișnuit, dat fiind că el conține un grup de substanțe a căror compoziție a fost numai parțial caracterizată. .

În al treilea rînd, rolul fiziologic al interferonului în celulele care îl produc, sau în afara acestora, rămîne obscur. S-a stabilit, totuși, că el intervine în reglarea replicării virale în celulele eucariote. Efectele secundare ale acestei substanțe nu sînt nicidecum de subestimat, chiar dacă, în unele tratamente anticanceroase, ele par mai puțin grave decît cele produse de chimioterapie.

În aceste condiții, autoritățile sanitare aveau de optat între două atitudini: a permite punerea pe piață a interferonului numai pentru unele indicații antivirale (ca de pildă, cheratita herpetică și hipertrofia larinxului) sau a pune în funcție un dispozitiv care să-i asigure controlul terapeutic.

Această din urmă soluție a fost reținută în Franța de către Ministerul Sănătății, care a și alocat un sprijin financiar producției de interferon.

Numai că, la începutul lunii noiembrie 1982, comisia științifică însărcinată cu organizarea în Franța, a testărilor terapeutice destinate punerii în evidență *in vivo* a proprietăților antitumorale ale interferonului leucocitar (produs de Institutul Pasteur și de Centrul Național de Transfuzii Sanguine), a decis întreruperea acestei experimentări clinice. Decizia survenea după stoparea, în iunie 1982, a producției acestui tip de interferon, de către Institutul Pasteur Production (v. p. 39), ca urmare a celor patru cazuri de deces din rîndurile bolnavilor de cancer, cărora li se administrase intravenos interferon leucocitar. Era vorba de testări de faza I, în cursul cărora bolnavii de cancer, a căror stare generală era foarte alterată, sînt tratați cu substanțe foarte active, cu o toxicitate relativ mare. În atari condiții, accidentele nu constituie un fenomen excepțional și este greu de stabilit o legătură directă, de cauzalitate, între injectarea de interferon și decesul înregistrat. Accidentele subliniază, totuși, necesitatea verificării atente a purității produselor utilizate, dat fiind că ele puteau rezulta din cauza prezenței substanțelor toxice în interferonul insuficient purificat. Factorii răspunzători de producerea interferonului leucocitar în Franța și-au propus, de altfel, să procedeze la noi purificări ale întregului stoc existent (50 miliarde unități în noiembrie 1982). Dar aceste accidente au avertizat, totodată, că experimentările clinice nu trebuie realizate decît în cadrul strict reglementat, cu interferoni de origine bine definită și extrem de bine purificați.

Circumspecția arătată de „Medical Research Council" din Anglia era, și ea, de altminteri, semnificativă. Comentînd, în iunie 1980, rezultatele cercetărilor lui Sacher și Burke referitoare la prepararea anticorpilor monoclonali în vederea izolării interferonului, instituția britanică a făcut mențiunea că: „activitatea antitumorală probabilă" a acestei substanțe impune de urgență „testări destinate să verifice dacă interferonul poate fi într-adevăr util în tratamentul unei forme anume de cancer sau în al tuturor formelor de cancer". „Imperial Cancer Research Fund", tot din Marea Britanie, care a alocat în iunie 1980 un milion de lire sterline pentru efectuarea de testări clinice în 1981 și 1982, a emis opinii asemănătoare.

Pe scurt, se poate afirma, în stadiul actual al cercetărilor, că interferonul prezintă unele posibilități, dar ar fi iresponsabil să se susțină că eficacitatea acestei substanțe a și fost demonstrată. Ceea ce este important este să se determine rolul exact al interferonului în tratamentul diferitelor forme de cancer, dacă nu cumva se va ajunge — probabil — la concluzia că nu este decît încă un agent terapeutic în arsenalul antitumoral deja existent.

Testările clinice ale infterferonului ridică, de asemenea, problema de ordin etic. Pe ce criterii vor fi separați bolnavii care vor fi supuși tratamentului cu interferon de cei care vor beneficia de tratamentul clasic? Voluntariatul nu micșorează nicidecum amploarea problemei: Cum să-i informezi pe voluntari? Cum să-i previi asupra diferitelor posibilități terapeutice ale tratamentului la care vor fi supuși? În sfîrșit, după testările efectuate pe sute de bolnavi (pentru a obține o informație statistică semnificativă) va trebui să se aștepte, pentru fiecare caz în parte, cel puțin cinci ani spre a putea concluziona asupra eventualei vindecări. Abia atunci va putea fi vorba de omologarea medicamentului. Termenele riscă, așadar, să fie foarte îndepărtate. Interferonul ar putea să devină „medicamentul minune" de la finele anilor '80, dar numai în urma unui studiu internațional bine coordonat și efectuat pe baza analizei tuturor efectelor sale clinice.

Prevenirea riscurilor

Operațiunile de recombinare genetică sînt diferite de manevrarea germenilor patogeni obișnuiți: ele vizează cel mai adesea colibacilii care sînt găzduiți în mod normal de aparatul digestiv al omului și care, totodată, sînt foarte răspîndiți în mediul înconjurător; o sușă modificată se poate răspîndi foarte ușor, producînd astfel inconveniente grave. Pe de altă parte, eventualele aplicații ale ingineriei genetice trebuie considerate — ca orice inovație tehnologică — nu doar din unghiul avantajelor, dar și din perspectiva inconvenientelor sale. De exemplu, transferul de gene la cereale pentru fixarea azotului prin intermediul unui microorganism prezintă incontestabile efecte benefice; însă propagarea în sol a unui astfel de microorganism ar putea favoriza alte plante decît cerealele cultivate, rupînd echilibrul biologic, atît în cuprinsul asociațiilor vegetale, cît și în cel al biocenozelor animale. De altminteri, relativa penurie ce caracterizează anumite substanțe biologice, cum ar fi hormonii, ar fi urmată — după punerea la punct a procedeelor de sinteză cu ajutorul microbilor cu genom modificat — de o abundență care va conduce la utilizarea excesivă, a cărei justificare terapeutică este neîntemeiată.

Aceste riscuri i-au determinat pe specialiști să lanseze, în iulie 1974, un apel pentru autoreglarea experiențelor genetice. Dar, în februarie 1975, la Conferința de la Asilomar, în California, 140 de cercetători au decis întreruperea moratoriului pe care și-l impuseseră cu cîteva luni înainte. De la această dată, reglementarea evoluase în S.U.A. într-un sens favorabil con-

tinuării experimentărilor, ceea ce nu excludea, însă, vigilența pe plan etic [1]. La 16 martie 1981, „National Institute of Health" aprobase, în S.U.A., 31 proiecte de producție industrială (insulină, hormonul creșterii la oameni și bovine, somatostatină, interferon) prin cinci firme („Burns-Biotec", „Eli Lilly", „Genentech", „Hoffmann — La Roche", „Schering — Plough").

După îndoielile exprimate la mijlocul anilor '70, unii biologi vedeau pericolele potențiale ca fiind nesemnificative: microbii cu genom modificat nu au nici o șansă de supraviețuire în afara condițiilor de laborator. La fel, normele de securitate deveneau mai puțin aspre — cel puțin la nivelul construcției unităților de cercetare, din punct de vedere al constrîngerilor de natură fizică — deși normele de siguranță biologică se menținеau. În schimb, alți biologi își manifestau neliniștea față de caracterul destul de lax ce definea normele de securitate; ca și față de lipsa reglementărilor privind viitorul bioindustriei, unde locul recipientelor de cîțiva litri, folosite în mod curent în laboratoare în cultura microbilor cu genom modificat, va fi luat de fermentatoarele cu capacitate de mai mulți metri cubi (Chantrenne, 1981).

În februarie 1982, „Recombinant DNA Advisory Committee" (RAC) — comitet consultativ al lui „National Institute of Health" — a propus o serie de schimbări la regulamentele privitoare la cercetările efectuate atît în universități, cît și în industrie, în domeniul recombinărilor genetice. Noul regulament a fost publicat la 21 aprilie 1982 și devenea aplicabil începînd cu acea dată. În ciuda puternicei presiuni contrare, care se baza pe realitatea că normele de control al cercetărilor avuseseră pînă atunci un caracter facultativ, regulamentul a fost menținut. Se stipula astfel că instituțiile de cercetare erau obligate să aibă o comisie de securitate, iar cele care dețineau laboratoare de tip P3 și P4 trebuiau să delege în mod special un funcționar pentru respectarea acestor norme. Menținerea unui astfel de sistem obligatoriu se explica, pe de o parte, prin teama unei reacții defavorabile a marelui public, iar, pe de altă parte, pentru ca, o dată cu retragerea reglementării federale, măsurile de securitate să nu rămînă la latitudinea factorilor locali sau a autorităților etatale (americane). Mai multe companii bioindustriale împărtășeau aceste temeri, dat fiind că reglementările fixate la scară locală puteau împiedica dezvoltarea bioindustriei, în vreme ce o reglementare unitară la nivelul S.U.A. părea mult mai compatibilă cu practicile industriale și comerciale. O altă rațiune în acest sens o constituia preocuparea unor membri ai RAC față de condițiile de securitate în care se efectuează acest tip de experiențe.

Adoptînd o atare atitudine, direcția NIH a respins propunerea făcută de Baltimore („Massachusetts Institutute of Technology" și președintele comitetului Științific Consultativ al Societății de Biotehnologie „Collaborative Research Inc.") și Campbell (Universitatea Stanford), care preconiza o relaxare a măsurilor de siguranță și control. Menținînd caracterul obligatoriu al acestor măsuri, reglementările s-au orientat și în funcție de propunerile făcute la RAC de către Gottesman, biolog molecular la „National Cancer Institute"; din punctul de vedere al Institutului, chiar dacă riscurile recombinărilor gene-

[1] Un exemplu de vigilență tradusă în fapte îl constituie măsurile adoptate de „National Institute of Health" împotriva profesorului Cline care în 1980, decisese să trateze două femei atinse de o afecțiune ereditară, cu tehnici de recombinare genetică. Dincolo de surpriza generală provocată în mediile științifice, acestea din urmă au calificat tentativa profesorului Cline drept hazardată și prematură.

tice erau reduse, se impuneau unele măsuri de precauție, pentru a evita consecințele dezastruoase ale unei erori.

Conform noii reglementări, din cele cinci categorii de experiențe supuse unui control riguros înainte de efectuare, trei necesitau obținerea unei autorizații de la NIH, și anume cele care vizau rezistența microorganismelor la substanțele medicamentoase și cele dedicate genelor ce guvernează sinteza toxinelor. Alături de acestea, era vorba de operațiile comportînd eliberarea în mediul înconjurător a organismelor cu genom modificat (cum sînt cele utilizate în lupta contra dăunătorilor culturilor). Capitolul rezervat nivelelor și modalităților de limitare a experiențelor la cadrul laboratorului erau simplificate în chip radical, dat fiind că multe din experiențele care necesitaseră pînă atunci aprobarea NIH puteau fi de acum realizate pe baza simplului acord al comitetului de securitate propriu fiecărei instituții,

În Franța, o comisie „etică" — înființată în martie 1975 — și o comisie tehnică erau însărcinate să studieze problemele referitoare la aplicațiile genetice, ca și reglementările corespunzătoare. La 13 septembrie 1982, ministrul cercetării și industriei a anunțat, în cadrul ședinței inaugurale a congresului internațional „De la Darwin la darwinism, știință și ideologie" constituirea unui comitet de bioetică medicală pe lîngă Institutul Național al Sănătății și Cercetării Medicale (INSERM). Acest comitet se adăuga, de fapt, unui comitet analog, care funcționa de mai mulți ani în cadrul INSERM, reunind „biologi ai Centrului Național de Cercetare Științifică, ai Institutului Național de Cercetare Agronomică, ai Institutului Pasteur și de la „College de France", membri ai personalului medical, reprezentanți ai instituțiilor judiciare, din lumea informațiilor și a protecției muncii, precum și exponenți ai marilor curente filozofice și spirituale". Rolul comitetului era „de a elucida marile probleme morale ridicate de cercetarea biologică, medicală sau de sănătate, care privesc omul, grupurile sociale specifice sau societatea întreagă",

O amplă dezbatere a avut loc în cadrul țărilor Pieței Comune asupra inconvenientelor rezultate din experiențele de genetică și asupra măsurilor ce se impun a fi luate în consecință, mai precis asupra reglementării funcționării laboratoarelor de risc maxim (P4 și P3),

Urmare a colocviilor ținute în 1981 la Limoges, Bruxelles și Copenhaga, Comitetul Economic și Social al Pieței Comune a considerat (în martie 1982) că riscurile aferente lucrărilor de recombinare a acizilor nucleici erau neînsemnate; se arăta, în același timp, că esențial era să se pună în continuare accentul pe studiile de evaluare a riscurilor, pe menținerea normelor de protecție, pentru asigurarea unei pregătiri speciale în materie de securitate microbiologică și pentru armonizarea dispozițiilor în vigoare în cadrul statelor membre, în așa fel încît să se asigure o concurență echitabilă în condiții de securitate corespunzătoare.

În ce o privește, Adunarea Parlamentară a Consiliului European a examinat, la 26 ianuarie 1982, la Strasbourg, un proiect de recomandări ce încercau să definească, pentru prima oară, legitimitatea aplicării de tehnici genetice la ființe umane. Era vorba de integrarea în Convenția Europeană a Drepturilor Omului a unor dispoziții vizînd protejarea individului de primejdiile inerente în cursul manevrelor genetice. Proiectul era un semn al neliniștii provocate atît de incertitudinea privind consecințele acestor tehnici pentru sănătatea omului și a mediului, cît și de problemele de ordin juridic și etic apărute. Raportul prezentat de comisia pentru probleme juridice a Adunării

Parlamentare conținea un pasaj destul de lung referitor la riscurile asociate lucrărilor cu gene umane, trei fiind etapele avute în vedere; prima privea stabilirea unei hărți genetice detaliate a celulelor umane, care să permită diagnosticul maladiilor ereditare, dar care să ofere, de asemenea, posibilitatea conservării în băncile de date a datelor informatizate ale caracterelor genetice individuale; a doua etapă corespunde modificărilor genomului celulelor somatice, de pildă, pentru înlocuirea genelor anormale, a treia etapă ar consta în modificarea genomului celulelor germinale pentru a crea schimburi permanente și ereditare. În pofida anumitor avantaje oferite de tehnicile genetice, raportul conchide că „deciziile umane nu trebuie să se substituie jocului liber al naturii" și că trebuie păstrat și afirmat dreptul fiecărei persoane „de a nu fi manevrată genetic".

Aceste propuneri reprezentau cea dintîi tentativă la nivel internațional de stabilire a unei protecții juridice împotriva consecințelor manipulărilor genetice. Trebuie să recunoaștem, totuși, că validitatea lor pe termen mediu va oscila în funcție de progresele realizate în cursul viitorilor ani în stăpînirea fenomenelor biologice.

Prevenirea riscurilor asociate lucrărilor de inginerie genetică implică, pentru oamenii de știință, obligația informării obiective a publicului, care-și va aduce, atunci, în mod conștient contribuția la dezbaterea problemei, în general limitată la sistemul instanțelor științifice și guvernamentale. E interesant de constatat, din acest punct de vedere, că dintr-o anchetă realizată în 1982 în Franța, 36% din persoanele chestionate se opuneau „manipulărilor genetice", 33% se arătau favorabile acestor tehnici, iar 31% se abțineau de la orice opinie. Conform aceleiași anchete, 94% dintre persoanele cu un nivel de instruire superior și 74% din cei în vîrstă de pînă la 24 de ani cunoșteau expresia „manipulări genetice". Oricum, ancheta demonstra că, cel puțin, înțelegerea noțiunilor fundamentale era un fapt; dacă termenul „cromozom" era familiar pentru 71% dintre persoanele chestionate, cel de „genă" spunea ceva pentru 59% dintre participanți, dar 80% nu știau ce este ADN-ul, iar 74% nu cunoșteau sensul noțiunii de biomasă. Informarea publicului prin intermediul unui sistem de popularizare științifică și tehnică de calitate, cu ajutorul mijloacelor de comunicare în masă, este cu siguranță un factor capital în dezvoltarea unei atitudini responsabile și a unei judecăți obiective asupra avantajelor și riscurilor cercetărilor efectuate în domeniul recombinărilor genetice.

Probleme etice și profesionale

Echipele de cercetători care lucrează în domeniul biotehnologiilor sînt angajate într-o competiție în care imperativele comerciale și cele științifice sînt foarte strîns legate. Împărțiți între lumea academică și lumea industrial-comercială, oamenii de știință sînt confruntați cu o situația conflictuală, între necesitatea publicării rapide a descoperirilor și obligația păstrării secretului, respectînd reglementările sistemului brevetelor. Unii, de teamă să nu fie dați la o parte, nu folosesc canalul tradițional de comunicare prin inter-

mediul revistelor de specialitate. Alții nu-și dezvăluie nici măcar colegilor rezultatele detaliate ale cercetărilor care sînt subvenționate de industrie; tăcerea care a înconjurat ani de-a rîndul cercetările în domeniul interferonului este simptomatică pentru o astfel de tendință generală.

Întîlnirea de la Pajaro Dunes, în California, organizată în martie 1982 cu scopul de a defini noul cadru al cooperării și relațiilor universitare — industrie în domeniul biotehnologiilor, cel puțin în S.U.A., a permis afirmarea cîtorva principii (v. pag. 251), dar a lăsat în umbră o serie de probleme ce continuă să apese asupra dezvoltării acestei colaborări. Astfel, una din consecințele contractelor încheiate între instituțiile de învățămînt superior, departamentele, membrii colectivelor universitare, pe de o parte, și întreprinderile comerciale, pe de alta, este frînarea liberei circulații a ideilor și rezultatelor, datorită competiției tot mai puternice pentru dobîndirea de avantaje comerciale. Reuniunea de la Pajaro Dunes a subliniat faptul că această tendință nu trebuie să încetinească progresul științific, însă măsuri concrete în acest sens erau greu de preconizat. Ce s-ar întîmpla, de exemplu, dacă doi membri ai aceluiași departament ar fi totodată agenți activi a două firme aflate în concurență, sau dacă doi colegi ar lucra pe post de consultant la două firme concurente, sau, mai mult, dacă cercetările efectuate de un grup de oameni de știință într-un laborator ar fi subvenționate de o întreprindere comercială care și-ar atribui drepturile exclusive pentru fiecare brevet? În fiecare din aceste cazuri, oamenii de știință s-ar abține să-și comunice concluziile lucrărilor lor, de teama să nu afecteze în vreun fel interesele „patronilor". Tendința se va accentua pe măsură ce în cercetarea științifică universitară oamenii de știință nu-i vor cunoaște pe cei care lucrează pentru companiile concurente. Pare, deci, esențial pentru a păstra caracterul specific al cercetării universitare și pentru a o feri de anumite disensiuni, ca toți cei care colaborează cu industria să fie cunoscuți, fără nici o excepție. Dar, atunci, cine va deține informațiile ? Și cum se va lucra cu acestea? Dacă șefii departamentelor sau directorii de instituții ar fi depozitarii acestor informații — inclusiv ai rezultatelor obținute — își vor putea asuma ei, oare, răspunderea difuzării lor, astfel ca să fie cunoscute interesele exterioare ale universitarilor?[1]

E adevărat că problemele ridicate de cooperarea dintre universități și industrie în domeniul biotehnologiilor conțin numai diferențe de grad față de problemele specifice altor domenii ale tehnologiei și la care universitățile s-au adaptat într-o formă sau alta. Exploatarea comercială a unei descoperiri în acest domeniu ar fi posibilă, într-adevăr, într-un timp mult mai scurt decît în chimie, de exemplu. Dar este evident, pe de altă parte, că cercetările efectuate în laboratorele universitare — în informatică, să zicem — au determinat, mai cu seamă în ultimii ani, progrese importante în domeniul industrial, drept consecință a colaborării mult mai strînse între universități și partenerii lor industriali; mediul universitar a devenit într-o măsură tot mai mare „consultantul" mediului industrial, în vreme ce laboratoarele sale au primit fonduri tot mai mari din partea partenerilor, un ajutor, de altminteri, tot mai necesar.

---

[1] La Universitatea din California, o reglementare stabilită de către „Fair Political Practice Commission" și aprobată la 1 martie 1982, stipula că orice cercetător care primea fonduri de la industrie trebuie să precizeze natura relațiilor sale cu societatea furnizoare de fonduri, să indice avantajele financiare rezultate sau așteptate din această colaborare și să-și prezinte proiectele de cercetare unui comitet al universității. Reglementarea avea să afecteze 2—5% din specialiștii universității.

Este, totuşi, esenţială cunoaşterea publică a acordurilor încheiate între universităţi şi industrie, spre a nu genera îndoială şi temeri, de a nu tulbura cu suspiciuni tradiţionala conlucrare din sistemul universitar şi nici de a afecta loialitatea cercetătorilor faţă de instituţia căreia îi aparţin.

De altfel este normal să ne întrebăm dacă nu cumva progresele biotehnologiilor nu au favorizat apariţia unui nou tip de biolog, mai puţin preocupat de înţelegerea mecanismelor fundamentale, cît de modificarea acestora într-un scop precis. Şi nu e deloc absurd să reflectăm la noi modalităţi de aplicare a ştiinţelor vieţii, ca şi la noile raporturi între oamenii de ştiinţă. În viitorul nu prea îndepărtat, o problemă pentru guverne va fi crearea de comunităţi de biotehnologi, conţinînd atît specialişti în biologia fundamentală, cît şi ingineri, spre a asigura găsirea celor mai adecvate soluţii la diferitele probleme de ordin practic. Dar va fi totodată nevoie să dispunem de specialişti preocupaţi de studierea pe termen lung a problemelor fără un interes industrial imediat.

O altă problemă importantă ridicată de dezvoltarea rapidă a aplicaţiilor biotehnologice este cea a evoluţiei şi a orientării cercetării în domeniul biologic. Aşa cum s-a întîmplat deja în alte discipline, în chimie de pildă, sau în fizică, sînt pe cale de apariţie noi modalităţi de organizare a cercetării biologice, noi raporturi între această cercetare şi industrie: laboratoarele vor fi dezvoltate în anumite ramuri, iar altele vor fi neglijate; formarea şi achiziţia de *know-how* vor fi ghidate conform unor orientări greu de modificat în timp. Toată această evoluţie a cercetării biologice se află, într-o măsură foarte mare, în mîinile biologilor înşişi. Se vor lăsa ei ghidaţi de interesele industriei, sau, ţinînd cont şi de cerinţele acesteia, vor reuşi să-şi păstreze autonomia şi să dezvolte cercetarea fundamentală, motorul progresului şi al oricăror aplicaţii viitoare?

Alegerea, transferul şi asimilarea de biotehnologii

Explozia biotehnologiilor şi marile avantaje, reale sau posibile, generate de acestea riscă să agraveze, o dată mai mult, disparităţile existente între ţările în curs de dezvoltare şi ţările dezvoltate (ca şi în interiorul acestora din urmă). În această ordine de idei, trebuie menţionat că, între 1967 şi 1971, atunci cînd utilizarea enzimelor imobilizate reprezenta cea dintîi dezvoltare a biotehnologiei, 30% din brevetele acestui domeniu existau numai în Anglia; dar între 1975 şi 1979, repartizarea celor 194 de brevete în lumea întreagă se prezenta cu totul altfel: 124 în Japonia, 39 în S.U.A., 9 în U.R.S.S., 8 în R.F.G., 7 în Franţa, 3 în Italia, 1 în Danemarca, 1 în Anglia şi 2 în alte ţări. E interesant de subliniat eforturile depuse de Piaţa Comună pentru a reduce dependenţa tehnologică a Europei de Japonia şi S.U.A.

La nivel naţional, raporturile dintre ştiinţele vieţii şi societate acordă un loc privilegiat biotehnologiilor şi recomandă un efort aparte pe planul cercetării şi al investiţiilor. Situaţia de aici o aminteşte pe cea existentă în microelectronică şi informatică, unde totuşi progresul tehnologic comportă riscuri numai pe termen scurt, asupra vieţii şi a sistemelor de producţie („revoluţia

în informație", automatizarea, robotizarea, controlul produselor, modificarea naturii însăși a acestor produse).

Acest interes se întemeiază pe ipoteza că trecerea la noile tehnologii contribuie la ameliorarea situației economice, inovația devenind condiția principală a competitivității, ea însăși fiind condiționată de aplicarea noilor tehnologii. Totuși, în biotehnologie, ca și în microelectronică, incertitudinea persistă, de unde și o serie de întrebări: care vor fi consecințele aplicării noilor tehnologii? În ce măsură previziunile asupra unei slabe creșteri economice vor fi contracarate de dezvoltarea acestor noi tehnici? Ce schimburi vor antrena ele în raporturile internaționale? Care va fi prețul lor social? Va urma inovația socială calea inovației tehnologice, pentru a configura o societate armonioasă și, mai ales, pentru a favoriza acele categorii sociale, pînă acum, neglijate?

Avînd în vedere efectele negative provocate în țările în curs de dezvoltare de către schimbările tehnice petrecute în țările industrializate, prin aplicarea microelectronicii care se propagă din sectorul serviciilor în cel al producției manufacturiere (automatizarea, robotizarea), rezultă că înmulțirea și extinderea biotehnologiilor ar putea conduce, mai devreme sau mai tîrziu, la modificări radicale ale naturii și structurii industriei agricole, chimice și farmaceutice. Drept consecință, lansarea pe piață a noilor produse ce se vor substitui produselor agricole tradiționale, va avea efecte negative asupra economiei țărilor în curs de dezvoltare, acestea fiind private de anumite debușeuri comerciale. Iată exemplul siropului de fructoză, a cărui consumare se extinde în lume: producția sa a fost maximă în 1981/82, concomitent cu o supraproducție de zahăr [1]). Persistența acestei tendințe și progresul continuu înregistrat în înlocuirea zaharozei cu siropurile de fructoză, în uzajul industrial și alimentar va avea drept consecință o creștere alarmantă a stocurilor de zahăr în 1985, în ciuda faptului că o reducere importantă a acestor stocuri se putea realiza grație altor utilizări industriale ale zahărului, ca de pildă fermentarea zahărului în etanol. Dificultățile țărilor exportatoare de zahăr se vor agrava cu atît mai mult cu cît piața zahărului este împărțită în structuri regionale destul de rigide, făcînd aproape imposibilă reorientarea exporturilor atunci cînd un cumpărător își reduce achiziția. Pe de altă parte, crearea — în țările exportatoare de zahăr — a unei industrii de transformare, folosind zahărul drept materie primă, reprezintă o soluție pe termen lung, dar aceasta reclamă timp și bani. În alte domenii, ca de exemplu în agroindustria producției de soia sau cea de proteine animale, produsele comercializate de țările industria-

[1]) Conform estimărilor făcute de experți, recolta mondială de zahăr din 1981/82 trebuia să atingă 98 milioane tone, în timp ce necesarul de consum era de circa 91 milioane de tone. Stocurile erau destul de mari, paralel cu existența altor factori ce agravau dezechilibrul pieței de zahăr. Pentru prima oară din 1976, S.U.A., cumpărătorul de zahăr nr. 1 și-a redus importul de la 5 la 3,5 milioane tone. Noi producători căutau să-și lichideze excedentele de producție: India, de exemplu, deținea stocuri evaluate la 4,5 milioane tone în 1982. Țările Pieței Comune și-au redus producția de la 15 la 11,75 milioane tone, pentru a-și putea elimina excedentul recoltei precedente, iar agricultorii francezi, situați pe primul loc în cadrul Comunității Economice Europene, în producția de zahăr, și-au redus cu 11,6% suprafețele cultivate cu sfeclă de zahăr. Supraproducția risca, afirmau experții, să împiedice remontarea prețurilor, pe lîngă faptul că recolta din 1982/83 se putea solda cu un nou excedent (prețul zahărului scăzuse, pe piața londoneză, de la 177 lire sterline tona, în februarie-martie 1982, la 100 lire sterline tona, în iulie 1982, revenind astfel la nivelul din 1977, dar situîndu-se, oricum, în termeni reali, la cel mai jos nivel din ultimul deceniu).

lizate (în speță prin filierele biotehnologice) riscă să fie mai competitive pe piața internațională, decît cele provenite din țările în curs de dezvoltare, chiar dacă fabricarea lor consumă mai multă energie.

Alături de aceste efecte negative asupra economiei țărilor în curs de dezvoltare, transferul nediferențiat al tehnologiilor către aceste țări agravează o dată mai mult dificultățile. Unele biotehnologii ajung într-adevăr la o bioindustrie intensivă în capital, care comportă riscuri financiare și importante cheltuieli de cercetare/dezvoltare, însemnate investiții din partea firmelor pentru cucerirea de noi piețe de desfacere, ceea ce reclamă, la rîndu-i, mînă de lucru de înaltă calificare și un mare efort în privința cercetării fundamentale. Adică exact condiții care cel mai adesea lipsesc din țările în curs de dezvoltare, unde capitalul este puțin, iar mîna de lucru supraîndestulătoare. Este adevărat că multe biotehnologii rezidă mai degrabă în ingeniozitate și pricepere, decît în știința cu o logică sofisticată, iar dezvoltarea lor se află la îndemîna țărilor mai puțin favorizate, cu condiția, firește, ca obiectivele acestora să fie bine definite. Factorii limitativi nu mai sînt atunci decît oamenii și ideile lor, ceea ce conferă un rol capital procesului de specializare a cadrelor, schimburilor și cooperării economice.

Alegerea și transferul biotehnologiilor merită, deci, o atenție specială, de natură să permită grefarea de sisteme tehnologice adaptate situației economice, sociale și culturale naționale. Ingineria genetica presupune cheltuieli la fel de disproporționate ca și inconvenientele, de același ordin ca și robotica, de pildă. În schimb, în măsura în care biotehnologiile nu se limitează la tehnicile de recombinare genetică, legate, de cercetările mai avansate ale biologiei moleculare, dar conțin numeroase tehnici de exploatare a resurselor microbiene, în această măsură, deci, multe țări în curs de dezvoltare oferă un capital de experiențe și practici care merită să fie ameliorate și care pot să aducă chiar mai mari avantaje decît ingineria genetică. Așa se întîmplă în cazul diferitelor fermentații în mediu lichid și solid, al compostajului și reciclajului deșeurilor, al producției, de biogaz, al hidrolizei celulozei și al descompunerii ligninei. Toate acestea pun în joc tehnologii care au nevoie de perfecționare, pentru a le mări randamentul. Este vorba aici de domenii în care rezultatele cercetărilor și ale transferurilor de cunoștințe și practici referitoare la biotehnologiile tradiționale perfecționate ar putea aduce servicii mai mari țărilor în curs de dezvoltare, decît introducerea celor mai avansate tehnologii. Surplusul de manoperă și biomasă, deficitul de capital impun adoptarea unor căi care să treacă la utilizarea celor mai adecvate tehnologii, prin specializarea tehnicienilor, mai întîi, și numai după aceea prin achiziționarea celor mai complexe tehnologii.

În țările în curs de dezvoltare, ca și în cele industrializate, una din prioritățile esențiale în economie este reducerea consumului energetic în producerea proteinelor. Crearea de cicluri de producere a proteinelor mai scurte, deci mai puțin costisitoare, pune în joc biotehnologii la scară mică, spre deosebire de cele al căror scop este fabricarea masivă de aminoacizi. Ciclurile mai scurte de producție prezintă, între altele, avantajul că protejează solurile, reduc despăduririle și nu fixează populația în mediul rural. Biotehnologiile pot contribui la rezolvarea problemelor legate de penuria alimentară și de aprovizionarea cu energie, în țările defavorizate din aceste punct de vedere. Aceasta, firește, dacă supravegherea alegerii, transferului și asimilării lor este una optimă și efectuată în funcție de contextul economic, social și cultural

propriu. Asigurînd difuzarea vaccinurilor, „prima revoluție biotehnologică", realizată ca urmare a lucrărilor lui Pasteur și ale contemporanilor săi, s-au salvat multe vieți. „Cea de-a doua revoluție biotehnologică", emanată din progresul științelor biologice din ultimele trei decenii, nu are dreptul să lase copiii să moară de foame după ce au fost protejați împotriva maladiilor infecțioase grație vaccinurilor cu eficacitate sporită. Pe terenul penuriei alimentare, așadar, biotehnologiile trebuie să-și aducă contribuția decisivă și tot în acest scop trebuie orientate importurile de tehnici, echipamente și *know—how*.

Prin intermediul programelor comune de cercetare/specializare puse la punct între țările industrializae și cele în curs de dezvoltare, în funcție de nevoile naționale, va fi posibilă nu numai ameliorarea utilizării biotehnologiilor tradiționale și, pornind de la aceasta, exploatarea resurselor alimentare și energetice, reducerea vulnerabilității prin sistemului agro-alimentar, dar și stimularea cercetării fundamentale ale cărei rezultate condiționează, la rîndul lor, randamentului biotehnologiilor. Acest efort de cooperare se justifică o dată în plus datorită faptului că ambele grupe de țări sînt în mod egal interesate de două aspecte esențiale ale biotehnologiilor: conservarea diversității genetice (colecții de culturi microbiene, selecția noilor sușe, noi varietăți de plante cultivate și rase noi de animale domestice) și inovația tehnologică. În sfîrșit, efectul dinamizator al acestei cooperări pe planul cercetării va contribui la micșorarea decalajului științific și tehnologic dintre țările industrializate și cele în curs de dezvoltare, avînd în vedere — mai devreme sau mai tîrziu — configurarea unei „bio-societăți", în care tehnicile de exploatare a resurselor naturale se vor întemeia în bună parte pe rezultatele cercetărilor biologice.

Cooperarea internațională

Cooperarea internațională și regională deține un rol important în configurarea unei perspective juste a progreselor biotehnologiei, cu scopul de a asigura transferul celor mai adecvate tehnologii la contextul economico-social al țărilor în curs de dezvoltare. Producția de biogaz, bioenergetica, fabricarea de vaccinuri sigure și eficace sînt, de exemplu, domenii promițătoare și care se pretează unei cercetări științifice de calitate. Domenii care, de altfel, pot să evolueze către o tot mai perfecționată tehnică de cercetare și care este rezervată, în prezent, numai anumitor țări dezvoltate.

Un exemplu de cooperare regională în materie de biotehnologii este oferit de Institutul Centro-American de Cercetări pentru Industrie (ICAITI). Institutul, instalat la Ciudad Guatemala, a fost creat în 1955 pentru a contribui la dezvoltarea industrială într-o regiune care oferea bune condiții bioindustriei. Aici, agroindustriile produc mari cantități de subproduse și reziduuri, solul permite culturile intensive, iar condițiile climatice sînt favorabile acesteia. Activitatea de cercetare/dezvoltare în biologie a început la ICAITI în 1970 și o unitate de biotehnologie s-a constituit prin regruparea de ingineri chimiști, microbiologi și biochimiști. Unitatea își are sediul la Centrul Internațional de Resurse Microbiene (MIRCEN) din regiune, patronat de UNESCO.

Cercetările desfășurate de acest institut se axează pe cele două agroindustrii predominante în regiune: cafeaua și producția de zahăr și derivate ale

zahărului. America Centrală producea în 1981: 10,6% din cantitatea mondială de cafea și 2,1% din cea de zahăr, reprezentînd principalele materii de export ale regiunii.

În cazul tratării fructelor arborelui de cafea pe cale umedă, învelișul mucilaginos al boabelor de cafea este eliminat prin fermentare naturală în mediu solid, în condiții de aerobioză și anaerobioză, utilizînd enzimele pectice proprii fructelor și pe cele ale microflorei care crește pe aceste fructe (Rolz, Salomon, 1982). Au fost făcute încercări pentru utilizarea pulpei fructelor de cafea, a mucilagiilor ce înconjoară boabele, a sucurilor și apelor reziduale provenite din diversele tratamente la care este supusă cafeaua, în vederea producției de biogaz și biomasă. Încercări de cultură a unor ciuperci filamentoase s-au efectuat în laborator și în stații pilot industriale (Rolz, Salomon, 1982).

Producția permanentă de alcool pe bază de suc de fructe tropicale urmată de producția semicontinuă de acid acetic, s-a perfectat în laborator pentru ca tehnologiile respective să fie transferate apoi în domeniul industrial. Producția siropurilor de fructoză pe baza trestiei de zahăr s-a realizat cu enzime de levuri imobilizate pe burete poliuretanic. Fermentarea legumelor, de felul castraveților, s-a efectuat de asemenea prin cultura pură de *Lactobacillus plantarum* sau de *Pediococcus cerevisiae* (Rolz, Salomon, 1982).

Națiunile Unite aveau în vedere crearea unui Centru Internațional de Genetică și Biotehnologie, în vederea promovării transferului de tehnologii între țările dezvoltate și țările în curs de dezvoltare (Stein, 1981). Ca urmare a recomandării făcute de un grup de specialiști în ingineria genetică, reuniți la Viena, în februarie 1981, sub egida O.N.U. pentru dezvoltarea industrială (ONUDI), a fost creată o delegație cu misiunea de a cunoaște opinia țărilor și a specialiștilor față de înființarea unui astfel de centru, ca și pentru definirea rolului și a funcțiilor acestuia.

Concluzia acesteia a fost că, în cadrul Centrului, trebuiau să lucreze laolaltă cercetători veniți din țările industrializate alături de cei din țările în curs de dezvoltare, care să aducă contribuții valoroase în domeniul ingineriei genetice și al biotehnologiilor, în mod deosebit pentru prosperitatea propriilor țări. Lucrările de cercetare și aplicarea rezultatelor obținute reprezentau instrumente eficiente în formarea noilor specialiști. Domeniile de cercetare recomandate de misiunea O.N.U. cuprindeau recuperarea petrolului din sondele în curs de epuizare, valorificarea energetică a biomasei, ameliorarea tehnicilor de fermentație, punerea la punct a celor mai eficace vaccinuri, la om și la animalele domestice, izolarea sau sinteza unor substanțe farmaceutice eficace împotriva maladiilor tropicale, selecția unor varietăți de plante cu proprietăți agronomice valoroase, transferul genelor fixatoare a azotului atmosferic la diverse plante. Centrul putea fi constituit din cinci departamente: trei de cercetare (biologie moleculară și biochimie; microbiologie și genetică moleculară; biotehnologie) unul de bioinformatică și unul de servicii generale.

Reprezentanții țărilor în curs de dezvoltare au meditat la structura Centrului, care, pe lîngă rolul deținut în materie de asimilare de tehnologii, ar fi avut o importanță deosebită pentru pregătirea de personal calificat, ca și pentru găsirea de soluții necesare multelor probleme ale țărilor în curs de dezvoltare. Centrul coordona totodată și o rețea de informare.

Proiectul a fost întîmpinat, după mărturia experților, foarte ta drabil de țările interesate, cu toate că unii factori de răspundere din domeniul științific au propus Națiunilor Unite să favorizeze mai întîi întărirea unor structuri naționale mai ales în pregătirea cadrelor specializate, înainte de a visa la realizarea Centrului respectiv (Stein, 1981).

Trebuie notat și faptul că, de mai mulți ani, programele elaborate de FAO și OMS, ca și de UNESCO, vizează extinderea cooperării internaționale în microbiologia aplicată și în biotehnologii.

Astfel, în 1962, UNESCO a patronat crearea Organizației Internaționale pentru Cercetări Celulare (ICRO), care în 1972 s-a asociat Programului Națiunilor Unite pentru dezvoltare (PNUE) spre a lansa un program mondial de salvgardare a patrimoniului genetic constituit din resursele microbiene și de a-l face, astfel, accesibil țărilor în curs de dezvoltare. În 1975 a început constituirea unei rețele mondiale de centre de resurse microbiene (MIRCEN), cu următoarele obiective: integrarea laboratoarelor avînd ca scop administrarea, distribuirea și utilizarea resurselor microbiene, și cooperarea între ele; conservarea microorganismelor, în special bacteriilor pentru fixarea simbiotică a azotului atmosferic (*Rhizobium*) în țările în curs de dezvoltare; elaborarea de tehnici locale, noi și mai puțin costisitoare; aplicarea microbiologiei în domeniul dezvoltării mediului rural; formarea de personal calificat și difuzarea informațiilor în domeniul microbiologiei generale și aplicate.

Prima etapă a realizării rețelei MIRCEN a fost crearea Centrului Mondial de Date privind Microorganismele, în Australia, care poseda o importantă colecție de sușe microbiene, ca și „Repertoriul Mondial al Colecțiilor de Culturi de Microorganisme". Alte centre din sfera MIRCEN sînt cele de la Bangkok, pentru Asia de Sud-Est, de la Nairobi, pentru Africa, de la Porto-Alegre, în Brazilia, pentru America de Sud, de la Ciudad de Guatemala, pentru America Centrală, de la Cairo, pentru statele arabe. MIRCEN din Hawaii își consacră lucrările fixării azotului atmosferic în leguminoasele tropicale, în vreme ce centrul din Stockholm s-a specializat în punerea la punct a truselor de diagnostic medical.

UNESCO a sprijinit, totodată, statele membre în stabilirea unor politici de cercetare și în realizarea unor proiecte de microbiologie aplicată și de biotehnologie, punînd accentul pe specializarea personalului și pe întărirea capacității de alegere a celor mai adecvate tehnologii propuse spre asimilare.

Bibliografie

Recombinări genetice şi domenii de aplicare. Hibridomi.

ABELSON, J.; BUTZ, E. (dir. publ.), 1980. „Recombinant DNA", *Science*, Washington, vol. 209, nr. 4463, p. 1317–1438.

ABERG, B. 1982, „L'hormone de croissance humaine par génie génétique. Un industriel raconte...", *Biofutur*, Paris, nr. 4, p. 29–33.

ALVARADO-URBINA, G.; SATHE, G. M.; LIU, W. C.; GILLEN, M. F.; DUCK P. D.; BENDER, R.; OGILVIE, K. K., „Automated synthesis of gene fragments", *Science*, Washington, vol. 214, nr. 4518, p. 270–274.

ANDERSON, W. F.; DIACUMAKOS, E. G., 1981. „Genetic engineering in mammalian cells", *Scientific American*, New York, vol. 245, nr. 1, p. 60–93.

BALKWELL, F. 1982. „Interferon: a progress report", *New scientist*, Londra, vol. 193, nr. 1298, p. 783–785.

BEALE, J. 1982. „Synthetic vaccines as the basis for future vaccines", *Nature*, Londra, vol. 298, nr. 5869, p. 14 şi 15.

BERG, P. 1981. „Dissections and reconstructions of genes and chromosomes", *Science*, Washington, vol. 213, nr. 4505, p. 296–303.

BITTLE, J. L.; HOUGHTEN R. A.; ALEXANDER, H.; SHINNICK, T.; SUTCLIFFE, J. G.; LERNER, R. A.; ROWLANDS, D. J.; BROWN, F. 1982. „Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesised peptide predicted from the viral nucleotide sequence", *Nature*, Londra, vol. 298, nr. 5869, p. 30–33.

BROOKSBY, J. B. 1981. „Genetic engineering and foot and mouth disea se vaccines", *Nature*, Londra, vol. 289, nr. 5798, p. 535.

CASELLAS, P.; GROS, P. 1982. „Les anticorps armés", *La recherche*, Paris, vol. 13, nr. 130, p. 240–242.

CHAMBON, P. 1981. „Split genes", *Scientific American*, New York, vol. 244, nr. 5, p. 48–59.

COCKING, E. C.; DAVEY, M. R.; PENTAL, D.; POWER, J. B. 1981. „Aspects of plant genetic manipulations", *Nature*, Londra, vol. 293, nr. 5830, p. 265–270.

COHEN, S. N. 1976. „Transposable genetic elements and plasmid evolution", *Nature*, Londra, vol. 263, p. 731–738.

COHEN, S. N.; SHAPIRO, J. A. 1980. „Transposable genetic elements", *Scientific American*, New York, vol. 242, nr. 2, p. 36–45.

CORNÉLIS, G. 1981. „Les transposons bactériens", *Revue de questions scientifiques*, Bruxelles vol. 152, nr. p. 317–334.

CRÉPIN, M. 1982. „Un nouvel outil en génie génétique", *Biofutur*, Paris, nr. 5, p. 33–35.

CRICK, F. 1979. „Split genes and RNA splicing", *Science*, Washington, vol. 204, nr. 4390, p. 264–271.

DAUSSET, J. 1981. „The major histocompatibility complex in man", *Science*, Washington, vol. 213, nr. 4515, 1469–1474.

DAVIDSON, E. H.; BRITTEN, R. J. 1979. „Regulation of gene expression; possible role of repetitive sequences", *Science*, Washington, vol. 204, nr. 4937, p. 1052–1059.

DAVIES, E. 1981. „Gene transfer in plants", *Nature*, Londra, vol. 291, nr. 5816, p. 531 şi 532.

DERYNCK, R,; CONTENT, J.; DeCLERQ, E.; VOLCKAERT, G.; TAVERNIER, J.; DEVUS, R.; FIRES, W. 1980. „Isolation and structure of a human fibroblast interferon gene", *Nature*, Londra, vol. 285, nr. 5766, p. 542—547.
— ; REMAUT, E.; SAMAN, E.; STANSSENS, P.; DeCLERQ, E.; CONTENT, J.; FIERS, W. 1980. „Expression of human fibroblast interferon gene in Escherichia coli", *Nature*, Londra, vol. 287, nr. 5779, p. 193—197.
EDGE, M. D.; GREENE, A.R.; HEATHCLIFFE, G. R.; MEACOCK, P. A.; SCHUCH, W.; SCANLON, D.B.; ATKINSON, T. C.; NEWTON, C. R.; MARKHAM A. F. 1981. „Total synthesis of a human leukocyte interferon gene", *Nature*, vol. 292, nr. 5825, p. 756—762.
FIERS, W.; CONTRERAS, R.; HAGEMAN, G.; ROGIERS, R.; VAN DE VOORDE, A.; VAN HEUVERSWYN, H.; VAN HERRWEGHE, J.; VOLCKAERT, G.; YSEBAERT, M. 1978. „Complete nucleotide sequence of SV40 DNA", *Nature*, Londra, vol. 273, nr. 5658, p. 113—120.
FRIEDMAN, R. M.; EPSTEIN, L. B.; MERIGAN, T. C. 1982. „Interferon redux", *Nature*, Londra, vol. 296, nr. 5859, p. 704—705. „Genetic engineering and biotechnology monitor" (UNIDO), Organizația Națiunilor Unite pentru dezvoltare industrială, nr. 1, februarie 1982.
GILBERT, W. 1981. „DNA sequencing and gene structure", *Science*, Washington, vol. 214, nr. 4527, p. 1305—1312.
— ; VILLA-KOMAROFF, L. 1980. „Useful proteins from recombinant DNA", *Scientific American*, New York, vol 242, nr. 4, p. 68—82.
GUILLEMIN, R.; BRAZEAU, P.; BÖHLEN, P.; ESCH, F.; LING, N.; WEHRENBERG, W. B. 1982. „Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly", *Science*, Washington, vol. 218, nr. 4527, p. 585—587.
HITZMAN, R. A.; AMMERER, G.; HALL, B. D. 1981. „Expression of a human gene for interferon in yeast", *Nature*, Londra, vol. 293, nr. 5835, p. 717—722.
HOGAN, B.; WILLIAMS, J. 1981. „Integration of foreign genes into tha mammalian germ line: genetic engineering enters a new era", *Nature*, Londra, vol. 294, nr. 5836, p. p și 10.
HOUGHTON, M. 1980. „Human interferon gene sequence", *Nature*, Londra, vol. 285, nr. 5766, p. 536.
KELLY, F. 1982. „Les manipulations génétiques d'embryons", *La recherche*, Paris, vol. 13, nr. 135, p. 832—842.
KHORANA, H. G. 1979. „Total synthesis of a gene", *Science*, Washington, vol. 203, nr. 4381, p. 614—625.
KITAMURA, N.; SEMLER, B. L.; ROTHBERG, P. G.; LARSEN, G. R.; ADLER, C. J.; DORNER, A. J.; EMINI, E. A.; HANECAK, R.; LEE, J.J.; VAN DER WERF, S.; ANDERSON, C. W.; WIMMER, E. 1981 „Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA", *Nature*, Londra, vol. 291, nr. 5816, p. 547—553.
KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. 1975. „Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity", *Nature*, Londra, vol. 256, nr. 5517, p. 495—497.
KOLATA, G. 1982. „Molecular biology of brain hormones", *Science*, Washington, vol. 215, nr. 4537, p. 1223—1224.
KÜPPER, H.; KELLER, W.; KURZ, C.; FORSS, S.; SCHALLER, H.; FRANZE, R.; STROHMAIER, K.; MARQUARDT, O.; ZASLAVSKY, V. G.; HOFSCHNEIDER, P. H. 1981. „Cloning of cDNA of major antigen of foot and mouth disease virus and expression in *E. coli*", *Nature*, Londra, vol. 289, nr. 5798, p. 555—559.
LEDER, P. 1982. „The genetics of antibody diversity", *Scientific American*, New York, vol. 246, nr. 5, p. 72—83.
MARX, J. L. 1981. „Globin gene transferred", *Nature*, Londra, vol. 213, nr. 4515, p. 1488.
— . 1982. „Monoclonal antibodies in cancer", *Science*, Washington, vol. 216, nr. 4543, p. 283—285.
McKUSICK, V. A.; RUDDLE, F. H. 1977. „The status of the gene map of the human chromosomes", *Science*, Washington, vol. 196, nr. 4288, p. 390—405.
MILSTEIN, C. 1980. „Monoclonal antibodies", *Scientific American*, New York, vol., 243, nr. 4, p. 56—64.
MINTY, A.; NEWMARK, P. 1980. „Gene regulation: new, old and remote controls", *Nature*, Londra, vol. 288, nr. 5788, p. 210 și 211.
NEWMARK, P. 1979. „New routes to polypeptide hormones", *Nature*, Londra, vol. 280, nr. 5724, p. 637 și 638.
— . 1980. „Biotechnology. Products work", *Nature*, Londra, vol. 285, nr. 5767, p. 607.
— 1981 a. „Human growth hormone. Shortage persists", *Nature*, Londra, vol. 294, nr. 5838, p. 200 și 201.

— 1981 b. „Interferon. Gamma winners", *Nature*, Londra, vol. 294, nr. 5836, p. 7.
— 1981 c. „Interferon: decline and stall", *Nature*, Londra, vol. 291, nr. 5811, p. 105 și 106.
NOVICK, R. P. 1980. „Plasmids", *Scientific American*, New York, vol. 243, nr. 6, p. 76—90.
OSUSKY, P. 1982. „L'insuline humaine: une prouesse biotechnologique", *Biofutur*, Paris, nr. 3, p. 25—34.
RABBITTS, T. H. 1976. „Bacterial cloning of plasmids carrying copies of rabbit globin messenger RNA", *Nature*, Londra, vol. 260, nr. 5548, p. 221—225.
ROBERTSON, M.; HOBART, M. 1981. „Antibodies, introns and biosynthetic versatility", *Nature*, Londra, vol. 290, nr. 5807, p. 543 și 544.
ROCHAIX, J. D.; VAN DILLERVIGER J. 1982. „Transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardii* with yeöst DNA", *Nature*, Londra, vol. 296, p. 70—72.
ROSNAY, J. de. 1981. „Biologie, informatique et qutomatique: l'essor de la biotique", *Prospective et santé*, Paris, nr. 18, p. 21—29.
SHAPLEY, D. 1982. „Genetic engineering. Human insulin", *Nature*, Londra, vol. 300, nr. 5888, p. 100—101.
SHERWOOD, R.; ATKINSON, T. 1981. „New microbes for genetic engineers", *New scientist*, Londra, vol. 91, nr. 1270, p. 665—668.
SHINE, J.; FETTES, I.; LAN, N. C. Y.; ROBERTS, J. L.; BAXTER, J. D. 1980. „Expression of cloned-Beta-endorphin gene sequences by *Escherichia coli*", *Nature*, Londra, vol. 285, nr. 5765, p. 456—461.
SIMPSON, A. J. G.; CIOLI, D. 1982. „The key to the schistosome's success", *Nature*, Londra, vol. 296, nr. 5860, p. 809 și 810.
TANIGUCHI, T.; MANTEI, N.; SCWARZSTEIN, M.; NAGATA, S.; MURAMATSU, M.; WEISSMANN, C. 1980. „Human leukocyte and fibroblast interferons are structurally related", *Nature*, Londra, vol. 285, nr. 5766, p. 547—549.
TÉOULE, R. 1982. „Les gènes artificiels", *La recherche*, Paris, vol. 13, nr. 131, p. 340—347.
TIOLLAIS, P.; CHARNAY, P.; VYAS, G. N. 1981. „Biology of hepatitis B virus", *Science* Washington, vol. 213, nr. 4506, p. 406—411.
WADE, N. 1982. „Hybridomas: the making of a revolution", *Science*, Washington, vol. 215, nr. 4536, p. 1073—1075.
WALGATE, R. 1982. „Interferon used at last", *Nature*, Londra, vol. 295, nr. 5847, p. 273.
YANCHINSKI, S. 1980. „What next for interferon?", *New scientist*, Londra, vol. 87, nr. 1220, p. 907—921.
ZUCKERMAN, A. J. 1982. „Developing synthetic vaccines", *Nature*, Londra, vol. 295, nr. 5845, p. 98 și 99.

Biotehnologiile și creșterea productivității vegetalelor.
Producția de substanțe utile cu ajutorul microorganismelor.

ANONIM. 1979. „Productions de substances naturelles par culture in vitro des tissus et de cellules végétaux". Colloque DGRST-APRIA, Tours, 1979, APRIA.
AUSUBEL F. M.; JANSSEN, K. A.; OW. D. W.; RIEDEL, G. E.; RUVKUN, G. B.; CANNON, F. C.; CANNON, M. C. 1980. „The use of recombinant DNA techniques in the study of nitrogen-fixing genes". In: Stewart, W.D.P.; Gallon, J. R. (dir. publ.), *Nitrogen fixation* (Proc. Phytochem. Soc. Eur.), p. 405—421. Academic Press.
BARZ, W.; REINHARD, E.; ZENK, M. H. (dir. publ.). 1977. „Plant tissue culture and its bio-technologycal applicatinos", Berlin, Springer-Verlag.
BRIERLEY, C. L. 1982. „Microbiological mining", *Scientific American*, New York, vol. 247, nr. 2. p. 42—51.
BUCHANAN-WOLLASTON, V.; CANNON, M. C.; BEYNON, J. L.; CANNON, F. C., 1981. „Role of the *nif* A gene product in the regulation of *nif* expression in *Klebsiella pneumoniae*", *Nature*, Londra, vol. 294, nr. 5843, p. 776—778.
CANNON, F. 1978. „Cloning of the *Klebsiella* nitrogen fixation *(nif)* genes", în: Boyer, H. W.; Nicosia, S. (dir. publ.), „Genetic engineering", p. 181—188, Amsterdam, Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
—, 1979. „Molecular and genetic analysis of Klebsiella NIF", în: Timmis, K.N.; Pühler, A, (dir. publ.), „Plasmids of medical environmental and commercial importance", p. 449—458. Amsterdam, Elsevier/North-Holland Biomedical Press.

CARANTINO, S. 1982 „Que fait-on des sous-produits de la fromagerie?", *Biofutur*, Paris, nr. 6, p. 31—33.
CARTER, G. B. 1981. „Is biotechnology feeding the Russians?", *New scientist*, Londra, vol. 90, nr. 1250, p. 216—218.
CIFERRI, O. 1981. „Let them eat algae", *New scientist*, Londra, vol. 91, nr. 1272, p. 810—812.
DaSILVA, E. J. 1982 „Les banques de souches", *Biofutur*, Paris, vol. 6, p. 35—40.
DEMAIN, A. L. 1981. „Industrial microbiology", *Science*, Washington, vol. 214, p. 987—995.
DIXON, R. 1978. „Genetic engineering in the fields", *New scientist*, Londra, p. 684—686.
— . 1980. „Genetics of nitrogen fixation in the bacterian *Klebsiella pneumoniae*", în: Leaver, C. J. (dir. publ.) „Genome organization and expression in plants, p. 427, 437, New York, Plenum Press.
— ; KENNEDY, C.; MERRICK, M. 1981. „Genetic control of nitrogen fixation", în: Glover, S.W.; Hopwood, D. A. (dir. publ.), „Genetics as a tool in microbiology. Society for General Microbiology Symposium, nr. 31", p. 161—185, Londra, Cambridge University Press.
ELMERICH, C. 1979. „Génétique et régulation de la fixation de l'azote", şi *Physiologie végétale*, Paris, vol. 17, nr. 4, p. 883—906.
EVANS, H. J.; BARBER, L. E., 1977. „Biological nitrogen fixation for food and fiber production. What are some immediately feasible posibilities?", *Science*, Washington, vol. 197, nr. 4301, p. 332—339.
EXPERT, D.; GOLDMAN, A.; TOURNEUR, J. 1980. „Le crown-gall: une manipulation génétique naturelle", *La recherche*, Paris, vol. 11, nr. 108, p. 212 şi 213.
FOWLER, M. 1981. „Plant cell biotechnology to produce desirable substances", *Chemistry and industry*, nr. 7, p. 229—233.
HENNEQUIN, J. R.; STECK, P.; RONCUCCI, R. 1982. „Cultures de cellules végétales: des perspectives industrielles nouvelles", *Biofutur*, Paris, nr. 4, p. 11—17, nr. 5, p. 41—47.
HILL, S.; KENNEDY, C.; KAVANAGH, E.; GOLDBERG, R. B.; HANAU, R. 1981. „Nitrogen fixation gene *(nif* L) involved in oxygen regulation of nitrogenase synthesis in K. *pneumoniae*", *Nature*, Londra, vol. 290, p. 5808, nr. 424—426.
IMRIE, F. 1975. „Single-cell protein from agricultural wastes", *New scientist*, Londra, vol. 66, nr. 950, p. 458—460.
KENNEDY, C.; CANNON, F.; CANNON, M.; DIXON, R.; HILL, S.; JENSEN, J.; KUMAR, S.; MCLEAN, P.; MERRICK, M.; ROBSON, R.; POSTGATE, J. 1981. „Recent advances in the genetics and regulation of nitrogen fixation", în: Gibson, A. H.; Newton, W. E. (dir. publ.), „Current perspectives innitrogen figation", p. 146—156, Canberra, Australian Academy of Science.
KRENS, F. A.; MOLENDUCK, L.; WULLEMS, G. J.; SCHILPEROORT, R. A. 1982. „*In vitro* transformation of plant protoplast with Tiplasmid DNA", *Nature*, Londra, vol. 296, nr. 5852, p. 72—74.
KROL, A. J. M.; HONTELEZ, J. G. J.; ROOZENDAAL, B.; VAN KAMMEN, A. 1982, „On the operon structure of the nitrogenase genes of *Rhizobium leguminosarum* and *Azotobacter vinelandii*", *Nucleic Acids Research*, vol. 10, nr. 14, p. 4147—4157.
— ; — ; VAN KAMMEN, A. 1982. „Only one of the large plasmids in *Rhizobium Leguminosarum* strain PRE is a strongly expressed in the ednosymbiotic state", J. Gen. Microbiol., vol. 128, p. 1839—1847.
LANGLEY-DANYSZ, P. 1982. „Une technique séculaire de fermentation su soja", *Biofutur*, Paris, nr. 1, p. 33—35.
LEFEBURE, G.; ARLIE, J. P. 1982. „Les produits de fermentation et leurs usages industriels", *Biofutur*, Paris, nr. 6, p. 45—49.
LIORET, U. 1982. „Des palmiers éprouvette par millions", *La recherche*, Paris, vol. 13, nr. 135, p. 926—928.
MARX, J. L., „Ti plasmids as gene carriers. Agricultural applications of genetic engineering", *Science*, Washington, vol. 216, nr. 4552, p. 1305—1307.
PEDRUSA, F. O.; STEPHAN, M.; DOBEREINER, J.; YATES, M. G. 1982. „Hydrogen-uptake hydrogenase activity in nitrogen-fixing, *Azospirillum brasilense*", J. Gen. Microbiol., vol. 128, p. 161—166.
POSTGATE, J. R. 1977. „Consequences of the transfer of nitrogen fixation genes to new hosts", *Ambio*, Stockholm, vol. 6, nr. 2—3, p. 178—180.
— . 1980 a. „Nitrogen fixation in perspective", în: Stewart, W.D.P.; Gallon, J. R. (dir. publ.), „Nitrogen fixation" *(Proc. Phytochem. Soc. Eur.)*, p. 423—434, Londra, Academic Press.
— . 1980 b. „Prospects for the exploitation of biological nitrogen fixation", Phil. Trans. Roy. Soc. Lond., Londra, B. 290, p. 421—425.

— . 1981 „Microbiology of the free-living nitrogen-fixing bacteria, excluding cyanobacteria", în: Gibson, .A. H.; Newton, W. E. (dir. publ.), „Current perspectives in nitrogen fixation", p. 217—228, Canberra, Australian Academy of Science.
— . 1982 „Biological nitrogen fixation: fundamentals", Phil. Trans. R. Soc. Lond., B. 296, p. 375—385.
— ; CANNON, F. C. 1981 „The molecular and genetic manipulation of nitrogen fixation", Phil. Trans. Roy. Soc. Lond., Londra, B. 292, p. 589—599.
RAIMBAULT, M. 1975. „Fermentation sur milieux solide", în: Bobichon, L.; Durand, G., „Utilisation industrielle du carbone d'origine végétale par voie microbienne", Colloque de la section de microbiologie industrille de la Societé française de microbiologie, 9—10 mars, 1978, Toulouse, p. 185—191.
SANGWAN, R.; SANGWAN-NORREEL, B. 1976. „Du grain de pollen à la plante", *La recherche*, Paris, vol. 7, nr. 64, p. 176—179.
SASSON, A. 1970. „Le rôle des micro-organismes dans la biosphère et l'avenir de la microbiologie appliquée", Rabat, Société des sciences naturelles et physiques du Maroc, Institut scientifique chérifien, 166 p.
SCIENTIFIC AMERICAN, „Industrial microbiology, 1981, *Scientific American*, New York, vol. 245, nr. 170 p.
SHEPARD, J. F. 1982, „The regeneration of potato plants from leaf-cell protoplasts", *Scientific American*, New York, vol. 246, nr. 5, p. 112—121.
— ; BIDNEY, D.; SHAHN, E. 1980, „Potato protoplasts in crop improvement", *Science*, Washington, vol. 208, nr. 4439, p. 17—24.
SHERWOOD, M. 1974. „Single-cell protein comes of age", *New scientist*, Londra, vol. 64, nr. 925, p. 634—639.
STEINHART, P. 1982. „The future promise of biotechnology", *Economic impact*, Washington, U.S. International Communication Agency vol. 3, p. 41—47.
STEWART, W.D.P. (dir. publ.). 1975, „Nitrogen fixation by freeliving organisms", International Biological Programme no. 6, Cambridge, London, Cambridge University Press.
TUDGE, C. 1975. „Why turn waste into protein?", *New scientist*, Londra, vol. 66, nr. 945, p. 138 și 139.

Conversia deșeurilor și a subproduselor agricole și industriale
Producerea de energie cu ajutorul microorganismelor pornind de la biomasă; bioenergia

ANONIM, 1979. „Biogas utilization and comprehensive development in China", Paper submitted to ESCAP/UNEP Seminar on Environment and Development, Bangkok, 14—19 August 1979, Government of China, 8 p.
ANONIM, 1981. „Alcohol production from biomass in the developing countries / Production d'alcool à partir de la bioamsse dans les pays en developpement", Washington, D.C., World Bank, 75 p.
BARNETT, A. și colab. 1978. „Biogas technology in the Third World", International Development Research Center (IDRC), 132 p.
CHARTIER, P. 1980. „Le potentiel énergétique de la biomasse", *Futuribles* 2000, Paris, p. 19—34.
— ; DUPUY, P. 1978, „Matières premières d'origine végétale", în: Bobichon, L.; Durand, G., „Utilisation industrielle du carbone d'origine végétale par la voie microbienne", Colloque de la section de microgiologie industrielle de la Société francaise de microbiologie, 9—10 mars, 1978, Toulouse, p. 5—23.
— ; MERIAUX, S. 1980. „'Lénergie de la biomasse", *La recherche*, Paris, vol. II, nr. 113, p. 766—776.
COKER, E.; DAVIS, R. 1978. „Sewage sludge-waste or agricultural asset?", *New scientist*, Londra, vol. 78, nr. 1101, p. 298—300.
DASILVA, E. J. 1980. „Biogas: fuel of the future?", *Ambio*, Stockholm, vol. 9, nr. 1, p. 2—9.
— ; OLEMBO, R.; BURGERS, A. 1978. „Technique microbienne intégrée à l'usage des pays en developpement: tremplin du progrès économique", *Impact: science et société*, Paris, Unesco, vol. 28, nr. 2, p. 159—185.
DEMEYER, A.; JACOB, F.; JAY, M.; MENGUY, G.; PERRIER, J. 1981, „La conversion bioénergétique du rayonnement solaire et les biotechnologies", Paris, *Technique et documentation*, 352 p.
EVANS, W. C. 1977. „Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compunds in anaerobic environments", *Nature*, Londra, vol. 270, nr. 5632, p. 17—22.

FAO. 1977. „China: recycling of organic wastes in agriculture", *FAO soils bulletin*, Roma, nr. 40, 107 p.
HALL, D.; ADAMS, M.; GISBY, P.; RAO, K. 1980. „Plant power fuels hydrogen production", *New scientist*, Londra, vol. 86, nr. 1202, p. 72—75.
HOLLAENDER, A. și colab. (dir. publ.). 1980, „Trends in the biology of fermentation for fuels and chemicals", New York, Plenum Press, 591 p.
LECOCQ, A. L. 1982. „Les microbes contre la pollution chimique", *La recherche*, Paris, vol. 13, nr. 131, p. 131, 382 și 383.
LEE BON YANG; MC GARRY, M. G.; LEE KAM WING; GRAHAM, M. 1980. „Wastewater treatment and resource recovery", Ottawa International Development Research Center (IDRC), 47 p. (IDRC, 154 e.).
LOLL, U. 1978, „Aspects pratiques de la méthanogenèse", în: Bobichon, L.; Durand, G., „Utilisation industrielle du carbone d'origine végétal par la voie microbienne", Colloque de la section de microbiologie industrielle de la Société francaise de microbiologie, 9—10 mars, 1978, Toulouse, p. 135—157.
MANDUJANO, I. A.; ALFONSO FELIX, A. A.; MARTINEZ, A. M. 1981, „Biogas. Energia y fertilizantes a partir de desechos orgánicos. Manual para el promotor de la tehnologia", Quito, Organizacion Latinoamericana de Energia (OLADE) e Instituto de Investigaciones Electricas (IIE), Cuernavaca, Morelos, Mexico, 41 p. (Serie Publicaciones especiales OLADE, 6).
NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES 1977, „Methane generation from human, animal and agricultural wastes", Washington, D.C., National Academy of Sciences, 131 p.
OLADE 1981, „Biogas. Una bibliografia mundial", Quito, Organizacion Latinoamericana de Energia (OLADE) e Instituto Interamericano de Cooperacion para la Agricultura (IICA), San Jose, Costa Rica, 207 p. (Serie Publicaciones especiales, 5)
— „Strategies and technologies for implementing rural biogas programs in Latin America", Quito, Organizacion Latinoamericana de Energia (OLADE), 66 p. (Olade's documents, 11)
OSUSKY, P. 1982. „Plein soleil sur la bio-énergie". *Biofutur*, Paris, nr. 6, p. 23—26.
PALSSON, B.O.; FATH-AFSHAR, S.; RUDD, D. F.; LIGHFOOT, E. N. 1981. „Biomass as a source of chemical feedstocks: an economic evaluation", *Science*, Washington, vol. 213, nr. 4507, p. 513—517.
PRENTIS, S. 1981. „Microbes that capture the sun", *New scientist*, Londra, vol. 92, nr. 1275, p. 159—163.
SCHLEGEL, H. G. 1978, „Theoretical aspects of methanogenesis", în: Bobichon, L.; Durand, G. „Utilisation industrielle du carbone d'origine végétale par voie microbienne", Colloque de la section de microbiologie industrielle de la Société française de microbiologie, 9—10 mars, 1978, Toulouse, p. 133 și 134.
SMIL, V. 1976. „China's energy: achievements, problems, prospects New York, Praeger, 246 p.
— . 1979. „Energy flows in rural China", *Human ecology*, Park Ridge, III, S.U.A., vol. 7, nr. 2, p. 119—133.
SOFER, S. S.; ZABORSKY, O. R. (dir. publ.), 1981. „Biomass conversion processes for energy and fuels", New York, Plenum Press, 420 p.
THERY, D. 1981, „Les programmes biogaz en Inde et en Chine. Une technologie écologiquement appropriée dans deux contextes socio-économiques très contrastés", *Nouvelles de l'écodéveloppement*, Paris, Centre international de recherche, sur l'environnement et le développement, CIRED, supliment la MSH Informations, Maison des sciences de l'homme, nr. 18, septembrie, 1981, p. 21—25.
UNEP, 1981, „Biogas fertilizer system. Technical report on a training seminar in China", Nairobi, UNEP (Programme des Nations Unies pour l'environnement), 86 p. (UNEP reports and proceedings series, 2).
VAN BUREN, E. Ariene. 1980, „Biogas beyond China: first international trainig program dor developing countries" „*Ambio*, Stockholm, vol. 9, nr. 1, p. 10—15.

Dezvoltarea bioindustriei. Noi perspective, noi probleme

ANDERSON, E. S. 1978, „Genetic engineering — the manifest hazards" *New scientist*, Londra, vol. 79, nr. 1110, p. 34—35.
ANONIM, 1975, „Report of the working party on the experimental manipulation of the genetic composition of micro-organisme", Londra, Her Majesty's Stationery Office, 23 p.

ANONIM. 1980, „Biotechnology. Report of a joint working party" (Advisory Council for Applied Research and Development; Advisory Board for the Research Councils; The Royal Society), Londra, Her Majesty's Stationery Office, 63 p.
ANONIM. 1981. „Genèse et développement de la bio-industrie", *Revue d'économie industrielle*, Paris, Edit. techniques et économiques nr. 18, 380 p.
BARLET, A. 1981. „Quantifier les marchés de la bio-industrie pour mettre en évidence les priorités stratégiques", *Sciences et techniques*, Paris, nr. 82, p. 14—23.
BECKER, J. 1982. „Biotechnology Going Dutch", *Nature*, Londra, vol. 295, nr. 5845, p. 91.
BERG, P. 1977. „Genetic engineering: challenge and responsability" *Ambio*, Stockholm, vol. 6, nr. 5, p. 253, 261.
— ; BALTIMORE, D.; BRENNER, S.; ROBLIN III, R. O.; SINGER, M.F. 1975. „Summary statement of the Asilomar. Conference on recombinant DNA molecules", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Washington, vol. 72, nr. 6, p. 1981—1984.
Biofutur, le magazin européen de biotechnologie, Paris, nr. 1, mars, 1982, nr. 2, avril 1982, nr. 3, mai 1982, nr. 4, iunie 1982, nr. 5, septembrie 1982.
BUDIANSKY, S. 1982. „Mote trouble for Stanford's patent", *Nature*, Londra, vol. 298, nr. 5874, p. 595.
BULL, A.T.; HOLT, G.; LILLY, M.D. 1982. „Biotechnologie. Tendences et perspectives internationales/Biotechnology. International trends and perspectives", Paris, OCDE, 99 p.
CHANTRENNE, H. 1981. „Le point sur les manipulations génétiques", *Revue des questions scientifiques*, Bruxelles, vol. 152, nr. 4, p. 511—524.
COSSE-MANIERE, C. 1981. „1981: l'an de la biotechnologie", *Innovations et produits nouveaux*, Paris, nr. 27, 1981, p. 2 și 3.
CULLITON, B. J. 1982 a. „The Hoehcst Department at Maas General", *Science*, Washington, vol. 216, nr. 4551, p. 1200—1203.
— . 1982 b. „Monsanto gives Washington U. doll. 23,5 million", *Science*, Washington, vol. 216, nr. 4552, p. 1295 și 1296.
DAFSA, „Les biotechnologies dans le monde. Stratégies des entreprises et structures industrielles", Paris, DAFSA (în colab. cu *Biofutur*).
DASILVA, E. J. 1982. „Les banques de souches", *Biofutur*, Paris, nr. 6, p. 35—40.
DE HAAS, M. 1982. „Breveter la vie", *Biofutur*, Paris, nr. 3, p. 41—45.
DICKSON, D. 1980 a. „Patenting living organisms — how to beat the bug-rustiers", *Nature*, Londra, vol. 283, nr. 5743, p. 128 și 129.
— . 1980 b. „Genentech makes splash on Wall Street", *Nature*, Londra, vol. 287, nr. 5784, p. 669 și 670.
— . 1980 c. „More commercial genetic manipulation", *Nature*, Londra, vol. 287, nr. 5785, p. 769.
— . 1980 d. „Harvard finally backs off gene venture", *Nature*, Londra, vol. 288, nr. 5789, p. 311.
— . 1980 e. „Congress shares out patent licences", *Nature*, Londra, vol. 288, nr. 5791, p. 527.
— . 1980 b. „Stanford and UCLA plasmid patent", *Nature*, Londra, vol. 288, nr. 5791, p. 527 și 528.
— . 1981 a. „Mixed welcome for genes on Wall Street", *Nature*, Londra, vol. 290, nr. 5802, p. 77.
— . 1981 b. „Stanford sells gene-splicing licences", *Nature*, Londra, vol. 292, nr. 5823, p. 485.
— . 1981 c. „Stanford ready to fight for patent", *Nature*, Londra, vol. 292, nr. 5824, p. 573.
— . 1981 d. „Biotechnology's first casualty — so far", *Nature*, Londra, vol. 292, nr. 5826, p. 787.
— . 1982 a. „Companies run short of sales and capital. Cohen-Boyer patent extended", *Nature*, Londra, vol. 296, p. 3.
— . 1982, b. „Biotechnology. Looking ahead", *Nature*, Londra, vol. 296, nr. 5856, p. 383.
— . 1982 c. „Industry funds in universities. New guidelines emerge from Pajaro Dunes", *Nature*, Londra, vol. 296, nr. 5856, p. 381.
EMEJUAIWE, S. O.; OGUNBI, O.; SANNI, S. O. (dir. publ.). 1981. GIAM VI Global Impacts of Applied Microbiology Conference, Londra, New York, Academic Press, 652 p.
FREEMAN, K. 1982. „Join the queue for monoclonals", *Nature*, Londra, vol. 296, nr. 5856, p. 384.
GREGORY, G. 1982. „Biotechnology — Japan's growth industry", *New scientist*, Londra, vol. 95, nr. 1316, p. 308—310.
GROS, F.; JACOB, F.; ROYER, M. 1979. „Sciences de la vie et société. Rapport au président de la république", Paris, La documentation francaise, 288 p.
Journal of chemical technology and biotechnology, vol. 32, Ian. 1982, 363 p. Contributions to the Second European Congress on Biotechnology, Eastbourne, April 1981, Oxford, Blackwell Scientific.

JOZEFONVICZ, J.; JOZEFOWICZ, M. 1982. „Les biomatériaux", *La recherche*, Paris, vol. 13 nr. 134, p. 708–718.
MATANGKASOMBUT, P. (dir. publ.) 1979. „Proceedings of the Fifth International Conference on Gobal Impacts of Applied Microbiology", Bangkok, 535 p.
NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 1979. „Microbial processes: promising technologies for developing countries", Washington, D.C., 198 p.
NEWMARK, P. 1980. „The origins of biotechnology. Who's ahead, who's behind?", *Nature*, Londra, vol. 283, nr. 5743, p. 123, 124.
– . 1981 d. „Benefits and snags of yeast plasmids", *Nature*, Londra, vol. 290, nr. 5802, p. 77.
– . 1981 e. „Biogen digs in", *Nature*, Londra, vol. 293, nr. 5843, p. 599 și 600.
NORMAN, C.; MARSHALL, E. 1982, „Boom and bust in biotechnology", Science, Washington, vol. 216, nr. 4550, p. 1076–1082.
NORMAND-PLESSIER, F.; GUILLAUMES, M. 1982. „Dans le Programme FAST. L'avenir de l'Europe des biotechnologies", *Biofutur*, Paris, nr. 6, p. 18–22.
OVTCHINNIKOV, Y. A. 1982. „La biologie au service de l'homme", *Impact: science et société*, Paris, Unesco, vol. 32, nr. 3, p. 421–425.
REDFEARN, J. 1980. „Biotechnology. U.K. company gells", *Nature*, Londra, vol. 287, nr. 5781, p. 381.
– . 1981. „U.K. biotechnology. Still striving", *Nature*, Londra, vol. 294, nr. 5836, p. 6 și 7.
– . 1982. „Microbial collection. Bugs in hazard", *Nature*, Londra, vol. 295, nr. 5844, p. 6 și 7.
– . 1982. „Universities in industry. Imperial goals", *Nature*, Londra, vol. 296, nr. 5856, p. 382.
– . 1982. „U.K. biotechnology. A start in sight", *Nature*, Londra, vol. 296, nr. 5860, p. 794.
REHM, H. J.; REED, G. (dir. publ.). 1981 „Biotechnology – A comprehensive treatise", 8 vol. Weinheim Verlag Chemie; Letchworth U.K., The Royal Society of Chemistry, Distribution Centre, Blackhorse Road.
RICH, V. 1981. „Soviet biotechnology", *Nature*, Londra, vol. 292, nr. 5824, p. 574.
SALOMON, J.-J. (dir. publ.), 1982, „L'impact des biotechnologies sur le Tiers Monde", Colloque organisé dans le cadre du Programme FAST de la Commission des Communautés européennes en cooperation avec le CNRS et l'Unesco, 2–4 febr. 1982, Paris, Centre, Science, technologie et société. Conservatoire national des arts et métiers, 268 p.
SASSON, A. „Biotechnology – new hopes, new problems", în: Kinnon, C.M.; Kholodilin, A.N.; Orel, V. (dir. publ..), „From biology to biotechnology. Progress, protagonists and prospects in life science", p. 137–144, Brno, R.S.C., Unesco and the Mandelianum of the Moravian Museum, 153 p.
SASSON, A.; DASILVA, E. J. 1983. „Biotechnologies: un problème de société", *La recherche*, Paris, vol. 14, nr. 147, p. 1156–1161.
SCHUURING, C. 1982. „Biotechnology. Dutch go-ahead", *Nature*, Londra, vol. 296, nr. 5859, p. 698.
– . 1982. „New era vaccine", *Nature*, Londra, vol. 296, nr. 5860, p. 792.
SCRIBAN, R. (dir. publ.). 1982, „Biotechnologie", Paris, Librairie Lavoisier, 616 p.
SINSHEIMER, R. 1975. „Troubled dawn for genetic engineering", *New scientist*, Londra, vol. 68, nr. 971, p. 148–151.
STEIN, M. D. 1981. „Biotechnology. UN plans centre", *Nature*, Londra, vol. 293, nr. 5834, p. 600.
STEWMAN, S.; LINCOLN, D. și colab. 1981. „Recombination DNA breakthrough in agriculture, industry and medicine. A Delphi study", *Futures*, vol. 13, nr. 2, p. 128–140.
SUN, M. 1982. „DNA rules kept to head off new laws", *Science*, Washington, vol. 215, nr. 4536, p. 1079 și 1080.
UNESCO/UNEP/ICRO, „MIRCEN news, bulletin prepared jointly by the UNEP/UNESCO/ICRO Panel on Microbiology and Unesco to provide information on the activities of the regional Microbial Resources Centres (MIRCEN), Paris, Unesco, Divison of Scientific Research and Higher Education.
WALGATE, R. 1980. „The biology business", *Nature*, Londra, vol. 293, nr. 5743, p. 127–127.
– . 1980. „U.K. biotechnology. The Spinks report", *Nature*, Londra, vol. 284, nr. 5756, p. 502 și 503.
– . 1982. „U.K. director for U. S. Biogen laboratory", *Nature*, Londra, vol. 295, nr. 5844, p. 5.
WALSH, J. 1981, „Biotechnology boom reaches agriculture", *Science*, Washington, vol. 213, nr. 4514, p. 1339–1341.
WILKINSON, J. 1980. „Engineering a genetic revolution", *New scientist*, Londra, vol. 85, nr. 1197, p. 728 și 729.
YANCHINSKI, S. 1981. „Universities take to the market place", *New scientist*, Londra, vol. 192, nr. 1282, p. 675–677.

Biotehnologiile cuprind ansamblul procedeelor de transformare a materiilor prime reînnoibile și de producere cu ajutorul culturilor de microorganisme și de celule animale și vegetale a unei mari varietăți de substanțe utile omului. Perfecționarea acestor biotehnologii și dezvoltarea lor ca urmare a recentelor descoperiri în biologia moleculară vor produce schimbări profunde pe plan economic și social, deoarece activitățile bioindustriale privesc producția agricolă și nutriția, tratarea și prevenirea unor boli, satisfacerea nevoilor de energie și protecția mediului înconjurător.

Această lucrare de sinteză, care se adresează publicului larg, aduce informații prețioase pentru toți cei care vor să cunoască diversele aspecte ale unui domeniu dinamic și promițător al științei și tehnologiei. Ea prezintă problemele pe care, după modelul altor tehnologii cu evoluție rapidă, le ridică biotehnologiile la nivelul dezvoltării lor industriale, al răspîndirii lor în țările mai puțin favorizate și al adaptării lor la diferitele situații economice, sociale și culturale.

Lei 28